

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE O VENTRÍCULO
DIREITO E VASCULATURA PULMONAR DE RATOS

Sabrina Bertoli Rodrigues

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Vitória, Agosto de 2017

EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE O VENTRÍCULO
DIREITO E VASCULATURA PULMONAR DE RATOS

Sabrina Bertoli Rodrigues

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____/ ____ / 2017 por:

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – Orientador, PPGCF-UFES

Profa. Dra. Maylla Ronacher Simões – Coorientadora, PPGCF-UFES

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel – Avaliadora externa, UNICAMP

Prof. Dr. Roger Lyrío dos Santos – Avaliador interno, PPGCF-UFES

Coordenadora do PPGCF: Prof^a.Dr^a. Alessandra Simão Padilha

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2017

Bertoli, Sabrina Rodrigues 1987

EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE O VENTRÍCULO DIREITO E VASCULATURA PULMONAR DE RATOS

106 p., 29,7 cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Profº. Drº. Leonardo dos Santos

1 Ferro; 2 Artéria pulmonar; 3 Reatividade vascular; 4 Hipertensão pulmonar; 5 Espécies reativas de oxigênio.

A Deus, aos meus amados pais Gilberto e Graça, aos meus maravilhosos irmãos Rafael e Gabriela.

Você precisa conquistar aquilo que o dinheiro não compra. Caso contrário, será um miserável, ainda que seja um milionário (Augusto Cury).

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma forma de reconhecer que sozinha eu não teria conseguido. E não teria mesmo!

Primeiramente faço meu agradecimento a Deus...

Agradeço à minha MÃE! Por ser meu maior exemplo de força, de garra e de retidão. Minha melhor amiga, meu porto seguro, agradeço todo o cuidado e esforço até aqui, todo amor e toda amizade.

A você PAI, meu exemplo de bondade, o desapego a bens materiais, o de bem com a vida. Agradeço pela doce infância que me proporcionou junto à mamãe, agradeço por sermos tão amigos e próximos.

Agradeço também aos meus irmãos, como é bom tê-los por perto, agradeço pela amizade e companheirismo, agradeço por todas as vezes que foram fortes comigo durante toda a nossa vida, é mais fácil ser forte tendo alguém...

Agradeço a toda minha família, avós e avôs. Embora três de vocês não estejam mais aqui, enquanto estiveram me conduziram sempre ao melhor. A minhas madrinhas e padrinho, tias e tios, primas e primos!! Minha família de fé, temente a Deus, mas também festeira de arromba, que fazem parte de quem eu me tornei! Vocês também fazem parte dessa grande conquista!

Agradeço a você Leonardo Pignaton Francisconi, meu amigo, namorado, me ajudou, me ouviu, me viu chorar... compartilhou comigo alguns momentos importantíssimos para a conclusão do mestrado, agradeço seu ombro amigo, sua paciência e dedicação, obrigada por ser como é, por entender minha ausência e por me apoiar.

Agradeço à minha amada amiga Poliana Pazeto, por todo incentivo, por toda amizade, agradeço a Deus por você existir, você que compartilhou comigo experiências de vida nos nossos plantões de cada dia, viu e presenciou o meu desejo e esforço para ingressar no mestrado. Obrigada por tudo!

Agradeço à minha amiga Marcelle Marques, que sempre acreditou e me incentivou durante toda nossa graduação. Falava que sabia que eu conseguiria. Amiga eu consegui!

Agradeço a todas as minhas amigas lindas, por acreditarem que tudo isso era possível!

Agradeço à professora Wanize Rocha por acreditar desde o primeiro momento, foi sem dúvida essencial ao meu ingresso a pesquisa, acho que nem ela sabe o quanto foi importante em acreditar que eu era capaz quando ainda durante a faculdade a procurei para falar do meu desejo de fazer pesquisa, meu mais sincero agradecimento a você minha eterna professora!

Agradeço também ao Vinicius Bermond Marques por me receber no laboratório e me apresentar ao professor Leonardo dos Santos, por ainda depois estar comigo durante a minha iniciação científica e agora durante o meu mestrado, agradeço por cada dica, por cada conselho e pelo trabalho desenvolvido ao meu lado.

Agradeço também à coordenadora da Faculdade Novo Milênio, Margarete Rose Sampaio Fortes por também acreditar em mim. Pela sua amizade e apoio, por cada conselho e carinho distribuídos a mim.

Agradeço aos meus maravilhosos professores da graduação Andressa, Cassiano, Clay, Florêncio, Giovanna, Gustavo, Josy, Lauer, Leonardo, Maria Elisa, Pedro,

Priscila, Rosana e Taniamara por me capacitarem a profissional que hoje sou e fazer mais que isso, incentivarem a minha decisão.

Agradeço a você, professor Leonardo dos Santos por permitir meu ingresso à iniciação científica, abrir a porta da pesquisa para mim, me fazer crescer e evoluir como pessoa e profissional, ser o meu maior incentivador, patrocinar as minhas ideias e me apoiar sempre que precisei. Agradeço ainda por ser um professor justo, te acho um ser humano à frente do seu tempo e agradeço por estar presente no caminho que decidi percorrer. Agradeço pelas contribuições diárias na formulação, desenvolvimento e conclusão do meu mestrado.

Agradeço ao professor Dalton Vassalo, por ser tão generoso, por sempre ser tão prestativo, nunca me negou tirar uma dúvida, seja nos corredores do prédio da pós-graduação ou na sala de aula. Agradeço por ter feito parte da constituição deste programa, porque assim como eu, também outros tiveram a chance de expandir os conhecimentos na pesquisa, que bom que você nasceu!

Agradeço à Maylla, por toda colaboração ao meu mestrado. Você foi essencial, antes mesmo de ser minha co-orientadora, já me ajudava. Sempre tão prestativa, tão companheira e amiga. Agradeço por toda dedicação nas horas de estudos, nos esclarecimentos de dúvidas. Pelos conselhos, pelo carinho. É muito bom quando a gente descobre que tem com quem contar, e eu pude contar com você desde sempre!

Agradeço as professoras Ivanita e Alessandra por estarem sempre presentes, por serem solícitas e por sempre poder contar com vocês.

Agradeço Emilia Polaco Cobre, por todos os conhecimentos compartilhados, pela dedicação sempre que precisei, pelos conselhos e amizade. Muito obrigada por tudo!!

Agradeço ao Anderson, pela enorme diferença que fez para o desenvolvimento e conclusão do meu mestrado. Sempre tão respeitoso, nos dá aulas diárias de educação e pró-atividade, sempre disposto a ajudar, sempre por perto quando precisamos. Com certeza, o laboratório é um lugar muito melhor quando você está. Agradeço toda a ajuda, muito obrigada!

Agradeço à Cinthia e à Rose, por sempre nos ajudar com a secretaria e questões burocráticas, sempre ser tão gentis e solícitas.

Agradeço à equipe da higienização que faz do nosso espaço um local mais agradável para trabalhar. Vocês são fundamentais!

Agradeço à professora Maria Tereza Weitzel e suas alunas do departamento de química da UFES pela parceria.

Agradeço aos colaboradores do HUCAM pela mensuração do ferro sérico.

Agradeço a equipe maravilhosa do biotério central, sempre dispostos e prontos a nos ajudar. Agradeço ao Rodolpho, por sempre tentar atender as demandas em nosso prol.

Agradeço a todos os professores da pós, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e respeito, admiro cada um e um dia quero ter um pouquinho de cada um de vocês também em mim.

Agradeço à Priscila Rossi, pela amizade e carinho, pelos conselhos, pelas dúvidas esclarecidas, por sempre estar por perto e ser tão amiga, amo ter você por perto, você contribuiu e contribui para que eu seja uma pessoa melhor sempre.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica pelo compartilhamento de experiências e aprendizados. Em especial aos alunos Susana Curry também minha amiga, Tiago Lopes e Ingrid. Vocês fizeram dos meus dias de trabalhos mais felizes e menos pesados, obrigada por cada ajuda, pela amizade e respeito.

Agradeço especialmente às minhas grandes amigas Cleydianne, Dieli e Pollyanna, minhas amigas que conheci no mestrado, mas levarei pra vida! Agradeço todos os conselhos, todas as gargalhadas e experiências juntas, além do convívio profissional e do carinho que temos umas pelas outras. Existem amigos que são tão chegados quantos os irmãos, me sinto assim com vocês.

Agradeço a todos os meus colegas do LEMC, essa equipe vigorosa e que amo! Cada um com sua particularidade, personalidade, mas todos de uma maneira ou de outra foram essenciais. Mas aos que mais convivi, meu muito obrigado a cada dúvida esclarecida, cada risada distribuída, cada conselho dado por vocês: Ariane, Bruno, Camila, Cindy, David, Gilson, Emilly, Elis, Filipe, Karoline, Karolini, Patricia, Marito, Renata, Tatiani, Thiago e Wena.

Aos colegas da Pós Graduação dos demais laboratórios, sempre que precisei pude contar com vocês, muito obrigada!

À FAPES e CAPES pelo financiamento a essa pesquisa.

E por fim, mas não menos importante, a todos os animais que foram sacrificados nesse estudo, se não fosse por eles nada disso teria sido possível.

Sumário

Lista de tabelas	12
Lista de figuras	13
Lista de siglas e abreviações	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Ferro.....	20
1.1.1. Absorção, transporte, armazenamento e eliminação do ferro no organismo ..	20
1.2. A sobrecarga de ferro no organismo	23
1.2.1. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	26
1.2.2. Efeitos gerais da sobrecarga de ferro sobre o organismo	28
1.2.3. Efeitos danosos sobre sistema cardiovascular	30
1.3. A circulação pulmonar	32
1.3.1. Fisiologia circulatória e regulação do tônus vascular pulmonar	32
1.3.2. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar	35
1.4. SOBRECARGA DE FERRO E HIPERTENSÃO PULMONAR.....	36
1.5. Justificativa e hipótese	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.1.1. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Animais e composição dos grupos experimentais.....	43
3.2. Determinação do ferro sérico e tecidual	44
3.3. Avaliação ponderal e da ingestão de ração.....	46
3.4. Avaliação biométrica - pesos dos órgãos de interesse.....	46
3.5. Estudo da hemodinâmica ventricular.....	47
3.6. Reatividade vascular em artérias pulmonares de resistência.....	48
3.6.3. Papel do estresse oxidativo nos efeitos da sobrecarga de ferro.....	52
3.6.4. Papel do receptor AT ₁ nos efeitos da sobrecarga de ferro	52
3.7. Análise histológica pulmonar após sobrecarga de ferro	53
3.8. Produção <i>in situ</i> de óxido nítrico e ânions superóxido em artérias pulmonares de resistência de ratos após sobrecarga de ferro	55

3.9. Expressão proteica por Western Blotting	56
3.10. Análise estatística.....	59
4. RESULTADOS	61
4.1. Peso corporal e comprimento da tíbia	61
4.2. Consumo de ração	62
4.3. Biometria após 4 semanas de protocolo	62
4.4. Reatividade vascular de artérias pulmonares de resistência.....	64
4.4.1. Resposta contrátil ao cloreto de potássio.	64
4.4.2. Reatividade vascular ao agonista de receptor TP, U46619	65
4.4.3. Vasodilatação dependente do endotélio	65
4.4.4. Vasodilatação independente do endotélio	66
4.5. Estudo da hemodinâmica ventricular esquerda e direita	67
4.6. Níveis de ferro sérico e tecidual	68
4.7. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica na morfometria da artéria pulmonar	70
4.8. Mecanismos envolvidos na hiper-reatividade vascular pulmonar após sobrecarga de ferro	71
4.8.1. Papel do óxido nítrico nos efeitos da sobrecarga de ferro sobre a vasculatura pulmonar	71
4.8.2. Papel do estresse oxidativo na hipereatividade vasoconstritora das artérias pulmonares de resistência após sobrecarga de ferro.....	73
4.8.3. Papel do receptor AT ₁ sobre os efeitos da sobrecarga de ferro na reatividade contrátil e estresse oxidativo da vasculatura pulmonar	76
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO.....	90
6.1 Perspectivas futuras	90
7. REFERÊNCIAS.....	92

Lista de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros operacionais utilizados na F-AAS	45
Tabela 2 - Parâmetros biométricos de grupos experimentais	63

Lista de figuras

Figura 1 - Absorção e utilização do ferro.....	22
Figura 2 - Lesão vascular em hemólises crônicas e sobrecarga de ferro.....	38
Figura 3 - Artérias pulmonares de resistência e câmara para estudo in vitro.....	49
Figura 4 - Esquema ilustrativo do protocolo de reatividade vascular	50
Figura 5 - Protocolos de pré-incubação no estudo da reatividade vascular.	51
Figura 6 - Acompanhamento do peso corporal ao longo do tratamento.....	61
Figura 7 - Consumo alimentar ao longo do tratamento	62
Figura 8 - Resposta vasoconstrictora ao cloreto de potássio	64
Figura 9 - Efeitos da administração de ferro sobre a resposta vasoconstrictora.....	65
Figura 10 - Efeitos da administração de ferro sobre a resposta vasodilatadora.....	66
Figura 11 - Avaliação hemodinâmica do ventrículo direito	67
Figura 12 - Avaliação hemodinâmica do ventrículo esquerdo	68
Figura 13 - Níveis de ferro sérico e teciduais	69
Figura 14 - Análise dos depósitos de ferro no pulmão por histoquímica	70
Figura 15 - Histomorfometria do tecido e artérias pulmonares.....	71
Figura 16 - Papel do óxido nítrico nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares	72
Figura 17 - Papel do radical hidroxila e peróxido de hidrogênio nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares.	74
Figura 18 - Efeitos da sobrecarga de ferro sobre a produção de ânion superóxido em artérias pulmonares.....	75
Figura 19 - Papel do receptor AT ₁ nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares.....	76
Figura 20 - Reatividade vascular à angiotensina II e expressão do receptor AT ₁	77
Figura 21 - Papel do receptor AT ₁ na produção de ânion superóxido vascular após sobrecarga de ferro	78

Lista de siglas e abreviações

(DAF-2) Diacetato de diaminufluoresceína

(AA-COX) Ácido araquidônico formado pela ciclooxigenase

(NADPH) Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

(O₂^{•-}) Ânion superóxido

(KCl) Cloreto de potássio

(Cu/Zn SOD) Superóxido dismutase cobre/zinco

(+dP/dt_{máx} e -dP/dt_{máx}) Derivadas máximas de pressão intraventricular positiva e negativa

(DHE) Dihidroetídio

(EROs) Espécies reativas derivados do oxigênio

(HFE) Gene relacionado à hemocromatose

(GSSG) Glutathiona oxidada

(Gpx) Glutathiona peroxidase

(GSH) Glutathiona reduzida

(GCs) Guanilato ciclase solúvel

(GTP) Guanosina trifosfato

(IP3) Inositol 1,4,5-trifosfato

(L-NAME) N^ω-nitro-L-arginina metil éster

(M) Molar

(K⁺) Potássio

(HO[•]) Radical hidroxila

(TP) Receptor de tromboxano

(TIBC) Capacidade total de ligação do ferro

(TfR) Receptor de transferrina

(U46619) Agonista seletivo de receptor TP para tromboxano A₂

RESUMO

RESUMO

Embora seja essencial para homeostase em organismos uni- e pluricelulares, incluindo os mamíferos, o ferro (Fe) quando em excesso pode ser danoso. De fato, pacientes e modelos experimentais de sobrecarga de Fe exibem dano e disfunção em diferentes sistemas, incluindo o cardiovascular. Devido a este potencial efeito da sobrecarga de Fe conduzir a vasculopatia, e as evidências de associação de algumas condições clínicas de hemossiderose e hipertensão pulmonar, este estudo teve como objetivo identificar possíveis alterações na reatividade vascular de artérias de resistência pulmonares de ratos expostos a diferentes concentrações de Fe e investigar os mecanismos subjacentes. Para tanto, os ratos foram distribuídos e submetidos a injeções *i.p.* de ferro-dextrano, 10 mg/Kg/dia, 100 mg/Kg/dia e 200 mg/Kg/dia (sobrecarga severa), cinco dias por semana durante quatro semanas, e comparados com um grupo que recebeu injeções de solução salina (controle). Houve prejuízo no ganho de peso com o tratamento com Fe nas maiores doses, com níveis séricos e depósitos de Fe em tecidos que indicam sobrecarga significativa, confirmando nosso modelo experimental. Além disso, particularmente no grupo tratado com a maior dose (200 mg/Kg/dia), evidenciamos hipertrofia cardíaca direita e ventrículo esquerdo normal, sugerindo que o remodelamento de ventrículo direito (VD) não está relacionado a uma possível insuficiência da câmara esquerda. Associada à hipertrofia do VD, evidenciamos hipertrofia concêntrica com redução de raio interno dos vasos pulmonares de resistência, além de aumento da reatividade vascular ao agonista de receptor TP (U46619). Nos estudos *in vitro*, houve sugestão de redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que parecem ser mediadas por aumento na subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase. Além disso, o aumento na geração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) parece ser dependente da ativação do receptor do tipo 1 para angiotensina II (AT_1), visto que a incubação seu antagonista losartan impediu tanto a hiper-reatividade vascular quanto o aumento na detecção de $O_2^{\cdot-}$ no grupo Fe. Portanto, podemos pressupor que a disfunção vascular e a hipertensão pulmonar possam vir estabelecer um importante fenótipo a ser investigado na sobrecarga de ferro, além de constituir um possível alvo terapêutico para atenuar os prejuízos acarretados nessa condição, como falência do VD por exemplo, além de outras complicações.

Palavras-chave: ferro, artéria pulmonar, reatividade vascular, espécies reativas de oxigênio, endotélio.

ABSTRACT

ABSTRACT

Although it is essential for homeostasis in uni- and multicellular organisms, including mammals, excessive iron (Fe) levels can be harmful. In fact, patients and animal of iron overload exhibit damage and dysfunction in different systems, such as cardiovascular. Due to this potential effect of iron overload leading to vasculopathy, and evidences associating some clinical conditions of hemosiderosis and pulmonary hypertension, this study aimed to identify possible changes in vascular reactivity of pulmonary resistance arteries of rats exposed to different iron loading and investigate the underlying mechanisms. For this, the rats were distributed in groups and injected i.p. with iron-dextran at 10, 100 or 200 mg/Kg/day (severe overload), five days a week for four weeks, and compared with a group receiving saline injections (as control). There were reduced weight gain with Fe treatment at the highest doses, with Fe serum levels and tissue deposits indicating significant overload, confirming our experimental model. In addition, particularly in the group treated with the highest dose (200 mg/Kg/day), there was right ventricular (RV) hypertrophy and normal left ventricle (LV) morphology and function, suggesting that RV remodeling is not related to a possible LV failure. Associated with RV hypertrophy, we demonstrated concentric hypertrophy with reduction of internal diameter of pulmonary resistance arteries, as well as increased vasoconstrictor reactivity to TP receptor agonist (U46619) in the *in vitro* studies. There was reduced nitric oxide bioavailability and increased production of reactive oxygen species, which seems to be mediated by an increase in the gp91^{phox} subunit of NADPH oxidase. In addition, the increase in superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) appears to be dependent on the activation of the type 1 receptor for angiotensin II (AT₁), since the incubation with the AT₁ antagonist losartan prevented both vascular hyperreactivity and increased $O_2^{\cdot-}$ detection in the Fe group. Therefore, we can assume that vascular dysfunction and pulmonary hypertension may establish an important phenotype to be investigated in iron overload, besides being a possible therapeutic target to mitigate the damages caused in this condition, such as RV failure for example, in addition to other complications.

Key words: iron, pulmonary artery, vascular reactivity, reactive oxygen species, endothelium

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ferro

O ferro (Fe) é um metal de transição e, como muitos destes metais, pode assumir vários estados de oxidação. Importante componente na homeostase celular por participar de uma série de processos no organismo, sua habilidade em doar e receber elétrons faz com que ele seja essencial em diversas funções biológicas. Por ter participação na formação da heme, grupamento responsável por carrear oxigênio no interior da hemoglobina na forma hemoproteica, é fundamental na oxigenação celular; além disso, atua em vários outros processos como na síntese do ácido desoxirribonucleico e como transportador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (GROTTO, 2008; 2010).

1.1.1. Absorção, transporte, armazenamento e eliminação do ferro no organismo

A obtenção do Fe pelos seres vertebrados, incluindo o homem, ocorre pela alimentação e reaproveitamento de eritrócitos senescentes (GROTTO, 2008). O Fe da dieta apresenta-se de muitas maneiras, classificado como heme ou não-heme (FUQUA et al., 2012). O Fe heme está presente nas carnes e vísceras contendo hemácias, como componente da mioglobina e da hemoglobina. Já o Fe não-heme (férico ou ferroso) apresenta-se em diversas formas tanto nos alimentos de origem animal como vegetal. O Fe não-heme na forma férrica (Fe^{+3}) tem baixa solubilidade e biodisponibilidade, mas algumas condições favorecem sua solubilidade na luz intestinal, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes (GROTTO, 2010).

O Fe é absorvido nos enterócitos (figura 1), através de transportadores de membrana relativamente específicos ou para as formas heme ou não-heme, e esse processo pode ser contrarregulado pela ação da hepcidina, um hormônio polipeptídico secretado pelo fígado em resposta a níveis de Fe corporal elevado, já que não há mecanismo que podem ser recrutados para aumentar sua excreção (VANOAIKA et al., 2010). O Fe não-heme na forma ferrosa (Fe^{+2}) é absorvido por meio de um transportador de metais divalentes (DMT-1) e, dessa forma, todo Fe^{+3} deve ser antes reduzido a Fe^{+2} (por uma Fe-redutase acoplada a borda em escova). Por fim, para seu transporte através da membrana basolateral do enterócito, o Fe^{+2} utiliza a ferroportina, mesma proteína utilizada nas diferentes células do organismo para o transporte de Fe para fora desta determinada célula, processo também contrarregulado pelo hormônio hepcidina, nas situações de excesso desse elemento.

Para a distribuição e transporte, o corpo conta com processos que envolvem três proteínas: transferrina, receptor de transferrina e ferritina. A transferrina é responsável por conduzir o Fe e mediar sua internalização para os tecidos que possuem seu receptor. A transferrina é a principal proteína especializada na ligação e transporte do Fe não-heme, sendo que na forma Fe^{+3} é que ocorre este transporte. De maneira interessante, a maior parte do Fe^{+3} ligado a transferrina é proveniente da degradação da hemoglobina de eritrócitos senescentes, processo realizado pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial (baço, fígado, medula óssea) o que permite um considerável grau de reciclagem. Sendo assim, em condições normais apenas 1 % do Fe^{3+} ligado a transferrina é proveniente da alimentação. É pelas proteínas ferritina e hemossiderina ocorre o armazenamento intracelular. A ferritina é composta por uma parte proteica (apoferritina - a qual contém de 4000 a 5000 íons férricos) e por um

núcleo hidroxifosfato de ferro, sendo que a hemossiderina provém da digestão lisossomal de agregados de moléculas de ferritina (HOFFBRAND et al., 2001).

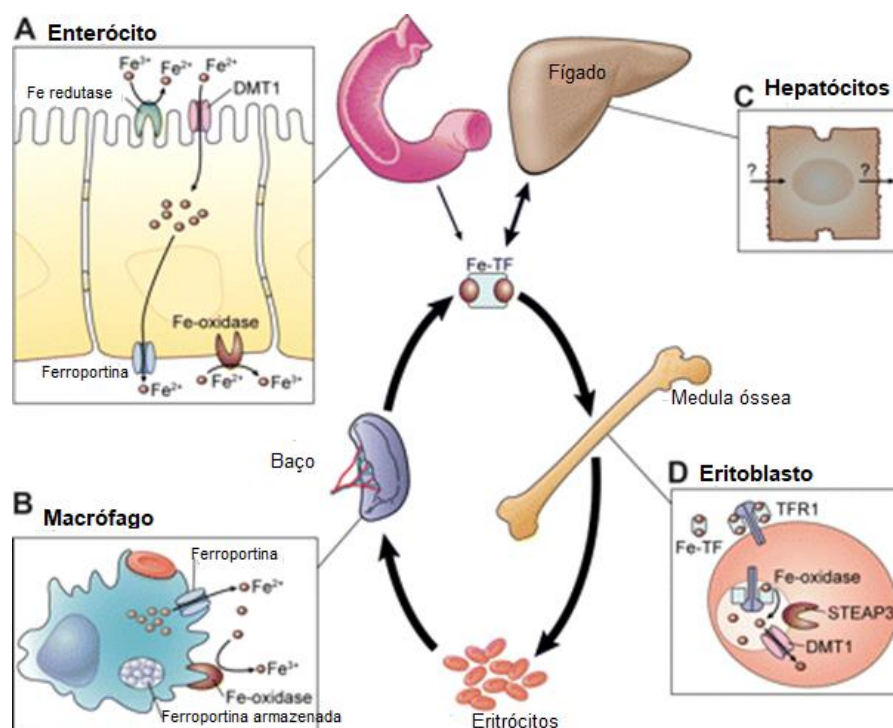


Figura 1 - Absorção e utilização do ferro. DMT1- transportador de metal divalente-1; TF- transferrina; TFR1- receptor específico de transferrina; STEAP 3- ferredutase. Adaptado de Andrews, N.C, 2006.

O Fe é armazenado no organismo para que, assim, tenha reserva interna se a necessidade for maior que a oferecida pela dieta; e também para atuar com proteção contra os efeitos tóxicos deste metal quando livre. Nesse sentido, as elevações do Fe livre podem ser decorrentes, por exemplo, quando a quantidade absorvida e/ou proveniente de transfusão de hemácias for maior que as quantidades perdidas e necessárias para a síntese de seus compostos funcionais (CANÇADO, 2007).

Em mamíferos sem sobrecarga, o Fe pode ser eliminado lentamente e de maneira relativamente constante, por descamação epitelial, secreções intestinais e sangramento menstrual. Em seres humanos adultos saudáveis, esta excreção de Fe é de aproximadamente 1 mg/dia, sendo que mulheres no período menstrual

apresentam ainda uma perda adicional de 0,5 a 1 mg/dia (KUSHNER et al 2001). Entretanto, como já mencionado, não existem formas eficientes conhecidas para regular ativamente a excreção de Fe. Por isso, o controle da absorção e dos estoques internos precisa ser rigorosamente regulado, pois em caso de insucesso, um estado de sobrecarga se estabelece (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

1.2. A sobrecarga de ferro no organismo

Sabe-se que o excesso deste elemento está associado à formação de radicais livres e peroxidação lipídica, comprometendo a função de diversos órgãos e sistemas (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). A sobrecarga crônica de Fe pode resultar de transfusões sanguíneas recorrentes, doenças hepáticas, hematológicas ou desordens genéticas que prejudicam seu metabolismo como as talassemias e hemacromatoses hereditárias (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004). O diagnóstico da sobrecarga é clínico e laboratorial. A medida que ocorre o acúmulo de Fe, este se deposita em diversos tecidos, dando origem aos sinais clínicos. A coloração bronzeada da pele, por exemplo, é um dos primeiros sinais (BEUTLER et al., 2000). O aumento no Fe sérico (normal: mulheres de 11-306,8 ng/mL e homens de 23,9-336,2 ng/mL) e da saturação da transferrina (normal: 20 %-50 %) são parâmetros laboratoriais que quando alterados, sugerem ou confirmam a sobrecarga do Fe (BEUTLER et al., 2000).

A toxicidade por Fe pode ocorrer tanto por uma dose única e excessiva como quanto por acúmulo crônico proveniente da dieta, uso inapropriado de sais de Fe ou transfusões sanguíneas repetidas. Clinicamente, as principais situações associadas à sobrecarga são as de causa primária (ex hemocromatose hereditária), em que há uma

exacerbação do processo absorptivo proveniente da dieta devido a defeitos genéticos; e as secundárias, também denominadas hemossideroses, normalmente associadas a outras doenças. As hemocromatoses primárias estão ligadas a polimorfismos em genes que normalmente codificam proteínas importantes na resposta contrarregulatória frente a aumentos de Fe no organismo e, por isso, resultam no aumento da absorção intestinal e ocasionam acúmulo anormal desse elemento em órgãos parenquimatosos (FLEMING, 2002). Dentre elas, as principais formas são a hemocromatose hereditária associada ao gene HFE (hemocromatose clássica) e hemocromatoses não associadas ao HFE [hemocromatose hereditária por mutação no receptor 2 da transferrina (TfR2), hemocromatose juvenil por mutação no gene para hemojuvelina (HJV), por mutação no gene para hepcidina (HAMP), doença da ferroportina (mutações no gene da ferroportina1) e sobrecarga de ferro africana] (PIETRANGELO, 2004a; PIETRANGELO, 2006a; PIETRANGELO, 2010).

Já as sobrecargas secundárias estão relacionadas principalmente a doenças hepáticas, hemolíticas, e outras condições associadas à transfusão periódica de concentrado de hemácias, levando à sobrecarga crônica do Fe contido na hemoglobina. Entre as doenças mais frequentemente associadas à sobrecarga transfusional, a talassemia beta maior se destaca (KUSHNER et al., 2001). A talassemia beta maior é um tipo de hemoglobinopatia de cunho hereditário em que se observa prejuízo total ou parcial na síntese de globina beta, sendo um tipo de anemia hemolítica que culmina na necessidade de repetidas transfusões de sangue ao longo da vida (VICHINSKY, 2005).

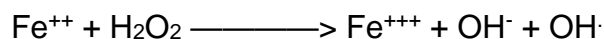
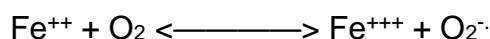
Para investigações a respeito da fisiopatologia dessas condições, diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos e utilizados, incluindo trabalhos do nosso grupo. Nesse ínterim, descrevemos tanto efeitos agudos da sobrecarga de Fe por

injeção parenteral sobre a função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de ratas (ROSSI et al., 2016) quanto os crônicos sobre o estresse oxidativo e disfunção vascular em ratos (MARQUES et al., 2015). Em relação a modelos que mimetizam as doenças genéticas, constatou-se um fenótipo de sobrecarga de Fe semelhante à hemocromatose humana utilizando camundongos transgênicos com ausência do gene da hepcidina (NICOLAS et al., 2001), HFE (ZHOU et al., 1998) e outros genes relacionados ao metabolismo do Fe (DRAKE et al., 2007; WALLACE et al., 2005), submetidos ou não a dietas com altos teores de Fe.

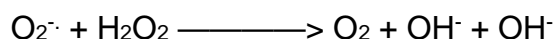
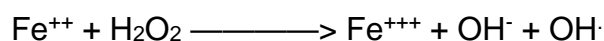
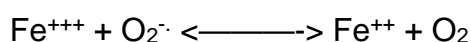
Além desses estudos, outros com administração crônica ou subaguda de Fe em camundongos (DAY et al., 2003; OUDIT et al., 2003; OUDIT et al., 2004; DAVIS & BARTFAY, 2004), e ocasionalmente em ratos (LOU et al., 2009; KRAMER et al., 2012; PARDO ANDREU et al., 2009), evidenciam danos cardíacos como resultado do acúmulo deste metal e do estresse oxidativo gerado, o que recapitula o cenário identificado em humanos com sobrecargas primária e secundária, a cardiomiopatia da sobrecarga de Fe (GAENZER et al., 2002; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2008).

A geração de estresse oxidativo pela excessiva formação de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) ocorre em nosso organismo naturalmente dependendo do contexto, mas também como um agente fisiopatológico. Entretanto, é fato que o Fe é um facilitador deste processo. Por facilmente modificar sua valência, o Fe é hábil não só no transporte de oxigênio, mas também em oxidação e redução de moléculas recebendo ou doando elétrons, e assim favorecendo a formação de EROs (EMERIT et al., 2001). Isso decorre principalmente porque quando livre no organismo pode participar como reagente nas oxidações celulares, conhecida por reação de *Fenton* e reação de *Haber-Weiss*, gerando radical hidroxila e ânions superóxido (GROTTO, 2010; KRAMER et al 2012).

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



1.2.1. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

As EROs referem-se a átomos ou moléculas extremamente reativos, produzidos a partir de reações químicas em que oxigênio participa, e que possui número ímpar de elétrons em sua camada de valência, sendo essa característica a responsável por conferir sua alta instabilidade e reatividade (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). No organismo, estão envolvidos em inúmeros processos vitais, embora em excesso atuem prejudicialmente gerando peroxidação dos lipídios de membrana e o acometimento às proteínas e ao DNA (BARREIROS et al., 2006; CELI, 2010; OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010).

Dentre as principais EROs de importância na fisiopatologia cardiovascular, podemos destacar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Este radical ocorre em quase todas as células aeróbicas e também é gerado durante estímulo de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1986, 1990). Além dele, o radical hidroxila

(OH[•]) é visto como a EROs mais reativa em sistemas biológicos visto que esses não possuem defesa endógena capaz de neutralizar sua ação, sendo que a associação rápida do OH[•] com metais ou outras moléculas químicas no próprio local onde foi sintetizado confirma sua alta reatividade. Assim, se o OH[•] for gerado perto do DNA e este estiver fixo a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, ocasionando à inutilização ou alteração do DNA. Além disso, pode inativar várias proteínas estruturais, enzimas e os componentes da membrana celular. Já o peroxinitrito (ONOO⁻) possui capacidade em induzir a peroxidação dos lipídeos das membranas provocando lesão endotelial e aumento da permeabilidade vascular (LANCASTER, 1996). Aliás, muitos estudos apontam que a incapacidade no relaxamento vascular dependente do endotélio está associada também à ação danosa do ONOO⁻ além da óbvia redução da biodisponibilidade do agente vasodilatador óxido nítrico (NO), consumido na formação do ONOO⁻ (DEWITT et al., 2001, STRUNK et al., 2001). Por último e não menos importante, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) possui capacidade transpor as camadas lipídicas, reagindo com proteínas ligadas ao Fe tais como, por exemplo hemoglobina, mioglobina e ferritina, tendo sua toxicidade aumentada na presença do íon Fe⁺² (EATON, 1991).

Vale salientar que o organismo dispõe de mecanismos naturais antioxidantes, sejam enzimáticos ou não, que são encarregados por impedir a formação ou eliminar essas substâncias tóxicas. Sendo portanto, antioxidante substância que, quando existente em baixa concentração relacionada à do substrato oxidável, reestrutura o substrato ou previne consideravelmente a sua oxidação (HALLIWELL et al., 2000). Assim, o efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando esses são produzidos em quantidade excessiva no organismo, extrapolando a capacidade antioxidante endógena, gerando dessa maneira o que denominamos estresse oxidativo. Dentre os

mecanismos enzimáticos da defesa antioxidante endógena, podemos destacar as enzimas: superóxido-dismutase, glutathione-peroxidase e catalase (HALLIWELL, 1987).

A superóxido dismutase é uma família de enzimas comuns que podem possuir diferentes cofatores tais como cobre, zinco, manganês, ferro ou níquel, dependendo da espécie. A SOD é a enzima mais abundante no organismo humano e importante defesa antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). Nos humanos são encontradas 3 formas: uma citoplasmática, uma mitocondrial e uma no líquido extracelular, sendo que a primeira e a terceira estão ligadas ao cobre e zinco (Cu/Zn-SOD) e a segunda contém manganês no seu centro reativo (Mn-SOD). Além da SOD, o organismo também tem importante atuação das enzimas glutathione peroxidase e catalase, ambas atuantes na degradação do H_2O_2 . Enquanto a catalase transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 , a glutathione peroxidase utiliza o H_2O_2 para transformar a glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) (CAI, 2005a).

1.2.2. Efeitos gerais da sobrecarga de ferro sobre o organismo

De fato, como já mencionado, o Fe possui regulação para sua absorção, porém por não ter uma via de excreta regulável, seu acúmulo culmina em prejuízos a diversos órgãos e sistemas. Isso decorre do fato de que, além de armazenado na forma de ferritina em macrófagos e outras células do sistema retículo endotelial, em se persistindo a sobrecarga, pode se acumular e gerar dano em várias outras células tais como hepáticas, miocárdicas, endócrinas e reprodutoras, além do sistema nervoso central (GIARDINA & GRADY, 1995). Vale salientar que o fígado é um órgão bastante afetado visto ser o principal local de armazenamento (SIDDIQUE & KOWDLEY, 2012;

SANTOS et al, 2012a; SANTOS et al, 2012b). O depósito contínuo de Fe no fígado desencadeia inflamação e fibrose que pode evoluir para cirrose e risco aumentado para hepatocarcinoma. Além disso, alterações no sistema endócrino têm sido recorrentes em pacientes e ou modelos experimentais com sobrecarga: no pâncreas o excesso de Fe pode gerar inflamação e interferir na capacidade da síntese de insulina, levando a um quadro de diabetes mellitus (BEUTLER E et al 2000), tem sido evidenciado o hipogonadismo devido a disfunção no hipotálamo, hipófise e gônadas (SIMINOSKI et al., 1990), podendo levar a agravos na síntese das gonadotrofinas, bem como suas ações ovarianas (EDWARDS et al., 1983). De maneira interessante, recentemente nosso grupo descreveu que mesmo uma única injeção de Fe em altas doses já é capaz de cursar com alterações morfofuncionais e dos níveis de hormônios no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de ratas, associados a altos níveis de EROs e depósitos significantes nesses sítios (ROSSI et al., 2015). Além desses danos mencionados, a artropatia com artralgia associada na sobrecarga crônica de Fe também é descrita. Embora o mecanismo envolvido na dor articular em pacientes com sobrecarga primária não seja esclarecido, uma hipótese é de que a elevação do seu conteúdo leva a um acúmulo de cristais de cálcio no interior do espaço articular, causando dor e, no decorrer do tempo, deformidade articular (BARTON et al., 1998; BACON et al., 1999; BACON et al., 2001).

Evidências clínicas e de modelos experimentais indicam a importância do Fe durante as fases de crescimento e desenvolvimento, e isso se justifica pela sua capacidade em participar de diversos processos no organismo (CZAJKA-NARINS DM, 1998). De maneira interessante, se por um lado a diminuição de Fe na dieta cursa com anemia, desnutrição e suas consequências (KANANI &POOJARA, 2000; DOMELLOF, 2007) incluindo alterações no metabolismo e déficit no crescimento (PRASAD, PRASAD,

1991), por outro lado também as doenças que cursam com excesso desse metal no organismo e lesão hepática são acompanhadas de perda de peso (BACON & BRITTON, 1990; ARTHUR, 1996; THAKERNGPOL et al., 1996; BONKOVSKY & LAMBRECHT, 2000; RAMM & RUDELL, 2005) e redução no crescimento (SKORDIS & KYRIAKOU, 2011). Alguns estudos experimentais com animais desmonstram que a sobrecarga crônica de Fe reduz a concreção endocondral na tíbia, assim como a constituição da medula óssea (MANDALUNIS & UBIOS, 2005; MANDALUNIS et al., 1997), sugerindo sua influência não só sobre o ganho de peso mas também sobre o desenvolvimento e crescimento ósseo. De maneira semelhante, estudos em nosso laboratório também indicam redução no ganho ponderal e do crescimento ósseo dos animais durante o protocolo de sobrecarga de Fe em ratos (MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017).

1.2.3. Efeitos danosos sobre sistema cardiovascular

A cardiomiopatia é uma das principais causas de morte em pacientes com sobrecarga de Fe secundária (ZURLO et al., 1989; PENNELL et al., 2013). Além disso, pacientes com sobrecarga primária também têm problemas cardíacos importantes tais como arritmias e insuficiência cardíaca (DEMANT et al., 2007).

Desde os anos de 1980, estudos demonstraram que a exposição aguda a altas concentrações de Fe *in vivo* ou *in vitro* é capaz de comprometer a função cardíaca de animais (ARTMAN et al., 1982; ARTMAN et al., 1984a, 1984b), e recentemente descrevemos alguns dos mecanismos envolvidos, tais como redução do influxo primário de cálcio no miócito e redução da sensibilidade dos miofilamentos (ÁVILA et al., 2016). Além disso, diversos modelos experimentais em camundongos

demonstram que a injeção crônica de Fe-dextran em altas doses induz toxicidade em diversos sistemas, incluindo o sistema cardiovascular (BARTFAY et al., 1999a; BARTFAY et al., 1999b; DAY et al., 2003), com elevada mortalidade associada a bradiarritmias a disfunção sistólica e diastólica, aumento da fibrose miocárdica e estresse oxidativo (OUDIT et al., 2003; OUDIT et al., 2004). Naturalmente, os impactos sobre função cardíaca se correlacionam com concentração de Fe tecidual (MOON et al., 2011) e mecanismos que reduzem o Fe circulante ou mesmo que impedem sua entrada nos miócitos são eficientes em reduzir esses danos (OUDIT et al., 2003). Apesar dessa descrição relativamente bem detalhada a respeito da cardiomiopatia relacionada a sobrecarga de Fe, e dos efeitos mediados pelo estresse oxidativo, pouco se sabe sobre os impactos dessa condição sobre a função endotelial e vascular. Alguns poucos trabalhos em humanos identificaram aumento do estresse oxidativo em combinação com prejuízo do relaxamento dependente do endotélio em condições de sobrecarga de Fe de origens primária e secundária (GAENZER et al., 2002; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2008). Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi evidenciado a participação das EROs na disfunção endotelial e alterações vasculares tanto em vasos de condutância (MARQUES et al., 2015) quanto de resistência (RIBEIRO JUNIOR et al., 2017) na circulação sistêmica, nenhum sinal de disfunção cardíaca. Dessa maneira, podemos supor que de fato há uma vasculopatia relacionada à sobrecarga de Fe, e que poderia anteceder a cardiopatia, pelo menos em modelos no rato. Considerando a importância da circulação pulmonar e sua íntima relação com a função cardíaca, tanto esquerda quanto direita, é de considerar que esta circulação igualmente possa sofrer efeitos diretos ou indiretos da sobrecarga de Fe.

1.3. A circulação pulmonar

Sob condições de homeostase, a circulação pulmonar está sujeita a um regime de baixa pressão, alta capacitância e baixa resistência ao fluxo sanguíneo, em consequência, pelo menos em parte, das artérias pulmonares exibirem paredes finas e distensíveis (CLEMLA et al., 2002). Este é somente um exemplo indicando que a circulação pulmonar detém características próprias, diferentes das evidenciadas na circulação sistêmica. Outro ponto de divergência é o papel das pressões parciais dos gases respiratórios na regulação do tônus arteriolar e das artérias de resistência: o aumento de oxigênio na circulação pulmonar contribui para uma vasodilatação, enquanto a nível sistêmico é estímulo para vasoconstrição. Por conseguinte, as arteríolas e artérias pulmonares de resistência se contraem com hipóxia, como demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro* (STAUB, 1985; ARCHER et al., 1989), e diferentes modelos de hipertensão arterial pulmonar associados a vasoconstrição frente à hipóxia crônica já foram descritos (SEMMENS & REID, 1974; RYLAND & REID, 1975; MACNEE, 1994a, b). Cabe ressaltar que cada tipo de célula (endotelial, muscular lisa e fibroblástica) presente nas paredes vasculares das artérias pulmonares desempenham um papel específico em resposta a estímulos (JEFFERY & MORRELL, 2002), e a seguir serão revisados alguns dos mecanismos básicos deste controle.

1.3.1. Fisiologia circulatória e regulação do tônus vascular pulmonar

O controle do tônus vascular é compreendido por mecanismos locais, humorais e neurais podendo ter atividade contrátil da musculatura lisa vascular aumentada ou diminuída, desempenhando papel na regulação do fluxo e resistência vascular

periférica (DEUSSEN et al., 2006). Por conseguinte, o mesmo se aplica para a circulação pulmonar, diferindo que neste leito, a regulação do fluxo visa uma eficiente perfusão alveolar e sucesso no processo de hematose.

No que se refere aos mecanismos locais de controle vascular, é consenso que o endotélio não atua apenas como um bloqueio entre o lúmen vascular e os elementos das paredes dos vasos, mas também como um tecido endócrino, ativo na síntese e liberação de substâncias que regulam o tônus e o desenvolvimento vascular, assim como coagulação e inflamação (FELETOU & VANHOUTTE, 2009; HIGASHI et al., 2009). Atualmente, está bem estabelecida a importante influência dos vasodilatadores e vasoconstritores dependentes do endotélio sobre a regulação da pressão arterial e fluxo sanguíneo, assim também como na perfusão tissular, momento a momento, tanto para a homeostase quanto medeando processos patológicos. Sendo assim, alterações desses mediadores vasodilatadores e vasoconstritores levam ao que se denomina disfunção endotelial. A disfunção endotelial é normalmente considerada um marcador de doença vascular e podem exercer papel tanto na geração, quando na manutenção e agravamento dos eventos clínicos. Portanto, é de suma importância que se conheçam os mecanismos endoteliais de regulação da homeostase vascular e que busque investigar que passos estão sendo impactados em determinada doença, incluindo aquelas da vasculatura pulmonar.

Embora o primeiro agente vasodilatador liberado pelo endotélio já tenha sido identificado em 1977 como sendo a prostaciclina (PGI_2), um metabólito derivado do ácido araquidônico pela ação da ciclooxygenase em células endoteliais (MONCADA et al., 1977), o óxido nítrico (NO) exerce um papel de destaque. O NO é uma molécula pequena e solúvel, que se difunde rapidamente da célula endotelial para células vizinhas do músculo liso, e é considerado o principal vasodilatador derivado do

endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; PALMER et al., 1987). Sua síntese se dá a partir da oxidação da L-arginina, reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), com posterior formação de NO e L-citrulina (PALMER RM et al., 1988). O NO é um importante vasodilatador também para a rede arterial pulmonar, sendo responsável por manter o tônus da circulação pulmonar equilibrada frente às situações que estimulam a vasoconstrição. Dessa maneira, doenças associadas à disfunção do endotélio pulmonar, como hipertensão pulmonar, cursam com menor produção de NO ou aumento de sua degradação, o que contribui para o prejuízo da regulação do tônus e maior vasoconstrição pulmonar (KINSELLA, J. P., S. H. ABMAN. 1996.). Não obstante, dependendo do leito vascular em questão, nem toda vasodilatação pode ser explicada pela ação do NO e da PGI₂, sendo que há uma outra via de relaxamento do músculo liso vascular que é estimulada pelo endotélio, e que age promovendo hiperpolarização do miócito. Atualmente, embora não haja uma única identidade molecular definida para o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), acredita-se que essa ação seja exercida por múltiplas vias e eventos, na dependência do leito vascular e a condição fisiológica ou patológica. De qualquer maneira, essa hiperpolarização parece depender da abertura de canais para potássio (FELETOU & VANHOUTTE, 2009). No músculo liso vascular há uma grande família de canais para potássio e, especificamente nos vasos pulmonares podem exercer importante papel na manutenção do tônus (BONNET & ARCHER, 2007).

Dentre os fatores constritores, os principais reguladores do tônus vascular pulmonar são: endotelina-1 (ET-1), angiotensina II, prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂). A endotelina (ET-1) por sinal, não afeta só o tônus da musculatura vascular, mas também promove o seu remodelamento e pode estar envolvida em doenças dessa vasculatura (CHRISTMAN et al., 1992).

Dessa maneira, alterações no padrão de síntese ou ação desses agentes endoteliais no pulmão são frequentemente descritas como contribuintes para geração e/ou manutenção de vasculopatias nesse leito, tais como a hipertensão pulmonar, por exemplo.

1.3.2. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma síndrome clínica hemodinâmica, caracterizada pelo aumento da pressão da artéria pulmonar, com pressão superior a 25 mmHg (MACHADO, 2006). As alterações na vasculatura pulmonar, que incluem vasoconstrição sustentada, remodelamento vascular e alterações na matriz extracelular, levam ao aumento da resistência vascular pulmonar (RABINOVITCH, 2001) e, conseqüentemente, à elevação das pressões arteriais pulmonares. Subsequente à elevação da pressão arterial pulmonar observa-se sobrecarga de VD, culminando em remodelamento e hipertrofia desta câmara, podendo progredir para insuficiência de VD e risco aumentado de morte (BENZA, 2012; HOEPER, et al., 2013).

Em modelos experimentais de HP normalmente é observado um aumento do peso do VD, enquanto peso de VE não é alterado (POLONIO et al., 2012). Aliás, um índice que utiliza a massa do VD normalizada pela massa do VE e septo interventricular tem sido correlacionado ao remodelamento do VD decorrente de HP e sobrecarga para esta câmara, denominado *Índice de Fulton*.

Um mecanismo importante que está subjacente à HP é a ação das substâncias vasoconstritoras que se sobrepõem à ação das vasodilatadoras, decorrentes por exemplo da expressão reduzida da NOS endotelial (eNOS) e expressão aumentada

da vasoconstritora ET-1 (endotelina1) (GLAID A et al., 1995; TUDER et al., 1999). Assim, além do remodelamento da parede do vaso pulmonar e trombose contribuírem para o aumento de resistência vascular, também há vasoconstrição excessiva relacionada à disfunção endotelial com produção prejudicada de vasodilatadores, como NO e PGI₂, juntamente com superexpressão de vasoconstritores como a ET-1 (TUDER et al., 2017).

1.4. SOBRECARGA DE FERRO E HIPERTENSÃO PULMONAR

Como já mencionado, independentemente do tipo, primária ou secundária, sabe-se que sobrecarga de Fe contribui para a deposição excessiva desse metal nos tecidos, incluindo tecidos endócrinos, fígado e o coração, sendo a cardiomiopatia da sobrecarga de Fe uma grande causa de morte nessas condições (OUDIT, 2003). Entretanto, além de cardiopatia, nos casos de anemias hemolíticas crônicas como a talassemia beta maior tem se observado cada vez mais a incidência de HP (HALALIS, 2005). De fato, a HP também tem sido causa de morbidade e mortalidade em pacientes com anemia hemolítica (GLADWIN et al., 2004), levando à sobrecarga do VD e, conseqüentemente, à falência ventricular direita (MCLAUGHLIN & MCGOON, 2006). Em um estudo de caso de um paciente beta talassêmico foi evidenciada HP grave associada a um aumento acentuado da resistência vascular pulmonar e fibrose intersticial pulmonar, com insuficiência VD mas função de VE preservada (ZAKYNTHINOS et al., 2001).

Apesar de ser multifatorial, tem-se especulado bastante a respeito dos possíveis mecanismos potencialmente responsáveis por essa alta prevalência (Figura 2): hemólise crônica, sobrecarga de Fe por terapia poli-transfusional,

hipercoagulabilidade, entre outros (AESSOPOS et al., 1995), tendo às altas taxas hemolíticas sido atribuída papel-chave no desenvolvimento da HP, levando à redução da biodisponibilidade de NO, estresse oxidativo, aumento do tônus vascular, inflamação, hipercoagulabilidade e remodelamento vascular (FARMAKIS & AESSOPOS, 2011;. FRAIDENBURG & MACHADO, 2016). Nesse sentido já é sabido que a disfunção de eritrócitos e os subprodutos da sua hemólise crônica podem contribuir para a diminuição da biodisponibilidade de NO. A hemoglobina livre reduz os efeitos do NO e suas propriedades vasodilatadoras dentro da circulação pulmonar por dois principais meios: o NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contém o núcleo heme inibindo sua atividade biológica (REITER et al., 2002; ROTHER et al., 2005); enquanto mesmo sua síntese é inibida pela liberação da arginase na hemólise e posterior depleção de seu substrato essencial a L-arginina (MORRIS et al., 2005). Assim, a hemólise crônica e a baixa biodisponibilidade de NO contribuem para a ativação plaquetária, disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo, o que resulta em dano tecidual ao longo do sistema circulatório, incluindo o território pulmonar (HAGGER et al., 1995; VILLAGRA et al., 2007).

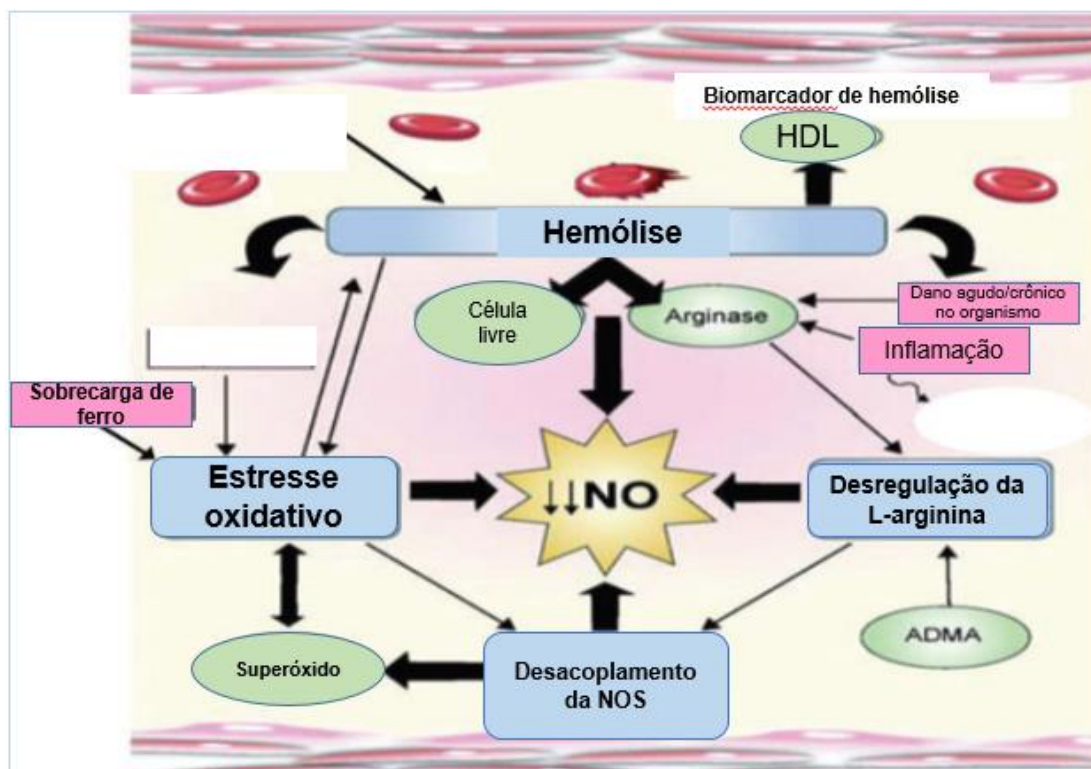


Figura 2 – Lesão vascular em hemólises crônicas e sobrecarga de ferro
Adaptado, Morris, C.R. 2008.

1.5. Justificativa e hipótese

É fato que a sobrecarga de Fe leva a uma exacerbada produção de EROs que supera os mecanismos antioxidantes endógenos e, desse modo, causa lesão oxidativa nas estruturas celulares que justificam hepatopatia, distúrbios endócrinos e cardiomiopatia (ÁVILA et al., 2016; ROSSI et al., 2016; A. SIDDIQUE & KOWDLEY, 2012). Além dos distúrbios mencionados, no cenário clínico evidencia-se alta incidência de HP em pacientes com hemoglobinopatias, incluindo as associadas a repetidas transfusões de sangue (AESSOPOS, & FARMAKIS, 2005; MOOM et al., 2011; FRAIDENBURG & MACHADO, 2016). Sabe-se que a HP afeta não só as pequenas artérias dos pulmões, caracterizada por remodelamento vascular e aumento da resistência vascular pulmonar, mas também induz uma sobrecarga hemodinâmica progressiva no VD (VALLERIE MCLAUGHLIN; MICHAEL D. MCGOON, 2006). Além disso, mesmo que um maior grau de sobrecarga de Fe e um maior número de transfusões também sejam

identificados como fatores de risco de HP na hemólise crônica (MELONI et al., 2015) e a despeito das evidências da capacidade perigosa de sobrecarga de Fe para a função vascular sistêmica (MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017), ainda não se sabe se o excesso de Fe no corpo, por si só, poderia ser responsável por induzir uma disfunção na vasculatura pulmonar. Portanto, para testar a hipótese de que sobrecarga crônica de Fe cause danos na vasculatura pulmonar de ratos, o que poderia contribuir para aumento da resistência vascular pulmonar e consequente hipertensão arterial pulmonar é que executamos esta pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da sobrecarga de ferro por quatro semanas sobre a circulação pulmonar e o ventrículo direito de ratos

2.1.1. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da injeção crônica de ferro dextrano em diferentes doses sobre o ganho ponderal, biometria e reatividade vascular pulmonar
- Avaliar a hemodinâmica ventricular direita em ratos anestesiados e submetidos à sobrecarga de ferro
- Investigar as alterações na resposta vasoconstritora e vasodilatadora *in vitro* de artérias pulmonares de resistência de ratos submetidos à sobrecarga de ferro
- Investigar os principais mecanismos envolvidos nas possíveis alterações vasculares provocadas pela sobrecarga de Ferro

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e composição dos grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar adultos jovens, com 2 a 3 meses de idade, pesando 200 g, cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em caixas coletivas, acondicionados em ambiente sob controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração especial para roedores. Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA-MCT, 2013) e foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (007/2013 CEUA-UFES).

Foram inicialmente compostos três grupos experimentais com administração crônica de Fe: exposição branda (10 mg/Kg/dia, que denominamos grupo Fe 10), exposição moderada (100 mg/Kg/dia, que denominamos grupo Fe 100) e exposição severa (200 mg/kg/dia). Os ratos dos grupos Fe receberam injeções intraperitoneais de ferro-dextran (Ferrodex®, 10 % p/v, marca Fabiani) 5 vezes/semana (segunda a sexta) durante quatro semanas, enquanto um grupo controle (Ct) recebeu por igual período injeção veículo com salina por via intraperitoneal no mesmo regime de aplicação dos grupos Fe. As análises foram feitas após quatro semanas de exposição crônica ao metal, pois foi um desenho originalmente proposto para camundongos (BARTFAY et al., 1999a; OUDIT et al., 2003) e recentemente adaptado para ratos em nosso laboratório (MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JR et al., 2017). Os animais foram pesados uma semana antes do início do tratamento e durante todo o tratamento, uma

vez por semana, totalizando cinco pesagens, e o conteúdo administrado de Fe era ajustado para o peso de cada animal.

3.2. Determinação do ferro sérico e tecidual

Ao final do tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas por meio de punção na artéria aorta abdominal e acondicionadas em tubos sem heparina, para obtenção de soro, por centrifugação a 6000 RPM por 15 minutos. A concentração de Fe e a capacidade total de ligação do Fe foram mensuradas em amostras de soro em duplicata por método colorimétrico direto (Análise bioquímica automática, CMD 800i da marca Wiener laboratories, Rosario, Argentina). O Fe sérico foi liberado da transferrina em tampão acetato (150 mM) com pH 4,5 e reduzido pelo ácido ascórbico (30 mM). A seguir, o Fe^{+2} , ao reagir com agente colorimétrico sulfonato pyridyl bis-phenyl triazine (ferrozine 0.2 mM), produzia cor margenta, que era mensurada a 560 nm. A porcentagem de saturação da transferrina foi calculada pela razão entre o Fe sérico e a capacidade total de ligação.

O Fe depositado nos tecidos foi determinado com um espectrômetro de absorção atômica ZEE nit 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha). As lâmpadas de cátodo oco (Analytik Jena) foram utilizadas como fontes primárias. As medidas de Fe foram feitas por espectrometria de absorção atômica por chama (F-AAS), usando a correção de fundo contínuo (lâmpada de deutério). As medidas foram repetidas quatro vezes para cada amostra. A taxa de acetileno e a altura do queimador foram ajustadas para obtenção de sinais de absorbância máximos. O acetileno (99,5 %, White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) e o ar sintético (99,999 %, White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados como combustível e gases oxidantes, respectivamente. As soluções

de calibração inorgânica foram preparadas a partir de soluções de estoque de 1000 mg/L de Fe (Specsol, São Paulo, Brasil) e 0,83 % v/v de HNO₃ como diluente. Os parâmetros operacionais utilizados para a determinação de Fe por F-AAS são descritos na Tabela 1.

Espectrômetro	
Linha (nm)	248.3
Fenda (nm)	0.2
Tipo de lâmpada	LCO
Corrente da lâmpada (mA)	6.0
PMT (V)	385.0
D2-HCL curr.	-
Chama	
Chama	C ₂ H ₂ /Ar
Fluxo de combustível (L/h)	65
Tipo de queimador (mm)	100
Altura do queimador (mm)	6.0
Taxa de nebulizador (mL/min)	5.0

Tabela 1 - Parâmetros operacionais utilizados na F-AAS

As amostras de órgãos foram secas durante cerca de 72 horas a cerca de 60°C e depois foram maceradas. Uma decomposição ácida assistida por microondas (GO Multiwave Anton-Paar, Áustria) foi realizada com as amostras usando uma massa de 0,1 g, 3 mL de HNO₃ 65 % p/p PA (Merck Millipore, EUA), 1 mL H₂O₂ 30 % v/v PA (Proquimios, Rio de Janeiro, BRA) e 4 mL de água ultrapura (resistividade <18,2 MΩ, PURELAB Ultra, ELGA, Reino Unido). Após o arrefecimento, a solução foi diluída para 15 mL. O espaço em branco foi preparado nas mesmas condições que as amostras experimentais. O limite de detecção obtido para determinações de Fe foi 0,098 mg/L.

3.3. Avaliação ponderal e da ingestão de ração

No início e ao final do período de administração de Fe, os animais foram pesados com o objetivo de avaliar se a sobrecarga de Fe interfere no ganho de peso dos animais. Para avaliar possíveis impactos sobre o crescimento ósseo e adequada normalização dos demais órgãos, a tíbia foi medida com auxílio de paquímetro após eutanásia dos animais, ao final dos protocolos.

Além disso, foi monitorado o consumo de ração semanal dos animais dos grupos Ct, Fe 10, Fe 100 e Fe 200. Toda a ração oferecida aos animais era pesada antes e, após o consumo a sobra também era pesada. Desta forma, conseguimos fazer o controle rigoroso do consumo semanal.

3.4. Avaliação biométrica - pesos dos órgãos de interesse

Após quatro semanas de exposição ao Fe, alguns órgãos de interesse foram delicadamente retirados após exsanguinação com os animais ainda sob anestesia (uretana 1,2 g/Kg i.p.) e foram pesados em balança de precisão o VE, VD e pulmões. Para avaliar o teor de água como sinal de congestão, os pulmões foram dessecados em estufa e após 48 horas foram novamente pesados. Os pesos dos órgãos foram comparados tanto como valores absolutos quanto corrigidos pelo peso corporal e tíbia do respectivo rato, e representados em mg/g e mg/mm, respectivamente.

3.5. Estudo da hemodinâmica ventricular

Após anestesia com uretana (1,2 g/Kg i.p.) os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. Previamente, o plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso na pata e, quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Todos os ratos foram mantidos sobre uma manta aquecedora e com suplementação aerossol de oxigênio (0,5 L/min) durante o procedimento cirúrgico e de registro. A canulação da jugular direita foi realizada com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) com extremidade curva, para facilitar a inserção no VD, e preenchido com salina heparinizada (50 UI/mL). O cateter foi acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A Biopac) conectado a um pré-amplificador interligado ao sistema de aquisição de dados (MP 100 Byopac Systems, Inc; CA), o qual permitiu que a pressão do VD fosse registrada e processada por um computador. Na carótida direita, por sua vez, foi inserido um microtransdutor de pressão acoplado ao cateter (SPR-320, Millar Instruments, CA) que foi direcionado ao VE para mensurar a pressão intraventricular através do mesmo software de aquisição/análise. Após registro, o cateter foi retraído para a artéria carótida para registrar a pressão arterial e verificar se houve lesão de válvula aórtica. Para o processamento dos dados foi utilizado período de estabilização de no mínimo 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência cardíaca (FC); pressões sistólica e diastólica final intraventricular direitas (PSVD e PDfVD) e esquerdas (PSVE e PDfVE); e máximas derivadas de pressão intraventricular positiva ($+dP/dt_{\text{máx}}$) e negativa ($-dP/dt_{\text{máx}}$) do VE e VD, estas últimas obtidas a partir da aquisição da primeira derivada temporal dos registros de ondas de pressão intraventricular.

3.6. Reatividade vascular em artérias pulmonares de resistência

Também sob anestesia, o tórax foi aberto para retirada cuidadosa de seu bloco cardiopulmonar que era acondicionado em uma placa de petri contendo solução gelada de Krebs-Henseleit (em mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 11,1 glicose e 0,01 Na₂EDTA). Posteriormente, a artéria pulmonar foi dissecada a partir da via de saída do VD e seus ramos de terceira ordem (Figura 3 A), que correspondem às artérias pulmonares de resistência, foram isolados e cortados em segmentos com aproximadamente 2 mm de comprimento. Estes segmentos foram montados em pequenas câmaras de miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca), entre dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) inseridos em seu lúmen para estudos de tensão isométrica, estando um dos fios conectado a um transdutor de tensão (Figura 3 B). Dessa maneira, é captada qualquer alteração de força decorrente de mudanças no diâmetro do vaso. Esse miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este a um computador. Após 30 minutos de equilíbrio em solução oxigenada e aquecida a 37° C e pH 7,4, os segmentos eram estirados para uma tensão equivalente a 3,99 KPa (25 mmHg) de pressão transmural, semelhante a pressão do sistema vascular pulmonar *in situ*, de acordo com o método descrito por MULVANY & HALPERN, 1977.

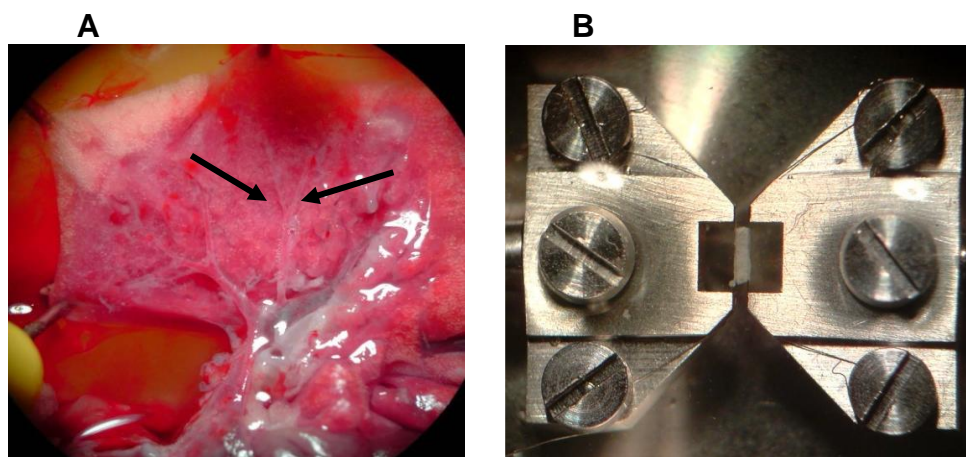


Figura 3– Artérias pulmonares de resistência e câmara para estudo in vitro
Dissecção das artérias pulmonares de resistência (ramos de terceira ordem), indicado por setas pretas (A). Anel
artéria Montado (2 mm de comprimento) em câmaras de miógrafo (B) Para testes de reatividade (Covre 2016).

Depois do processo de estiramento ótimo para sua normalização, os segmentos de artérias pulmonares de resistência foram expostos a uma solução com concentração alta de potássio (80 mM, a composição é similar ao Krebs Henseleit, no entanto o NaCl foi substituído por KCl em concentração equimolar) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos (Figura 4). Em seguida, a solução era novamente trocada para solução normal e após retorno à sua tensão basal, os protocolos descritos nos itens a seguir eram realizados. O teste de viabilidade do endotélio observado em outros leitos vasculares, fica inviável neste tipo de preparação devido ao prejuízo da resposta contrátil observada nas artérias pulmonares de resistência, realizando portanto, preparação já bem estabelecida em nosso grupo (COVRE, 2016). Após a avaliação da capacidade contrátil máxima, os diferentes anéis pulmonares de resistência seguiram protocolos diferentes. Isso porque os protocolos de estudo da reatividade contrátil e relaxante foram previamente avaliados na mesma preparação e foi concluído que os últimos protocolos são prejudicados pelo tempo da preparação. Dessa maneira, somente um protocolo era realizado em cada um dos anéis, e embora os ensaios de vasoconstrição ou vasodilação endotélio-dependente ou –independente

tenham sido feitos em diferentes anéis de artérias pulmonares, estes advinham do mesmo animal.

3.6.1. Efeitos da exposição ao ferro-dextrano em diferentes concentrações sobre a resposta vasoconstritora e vasodilatadora.

Após 30 minutos de estabilização, para estudar o efeito dos tratamentos sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio (Figura 4), foram realizadas curva concentração-resposta avaliada por meio da acetilcolina (ACh, 10^{-15} a 10^{-4} M) adicionada nas artérias previamente contraídas com serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT 10^{-4} ou 10^{-5} M, sendo escolhida a concentração suficiente para produzir 50 % da contração ao KCl) avaliando-se o percentual de redução da tensão em relação ao estado pré-contraído.

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada pelo relaxamento induzido pelo doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) (Figura 4). Em segmentos de artérias pré-contraídas com 5-HT foi realizada uma curva concentração-resposta ao NPS (10^{-13} a 10^{-4} M).

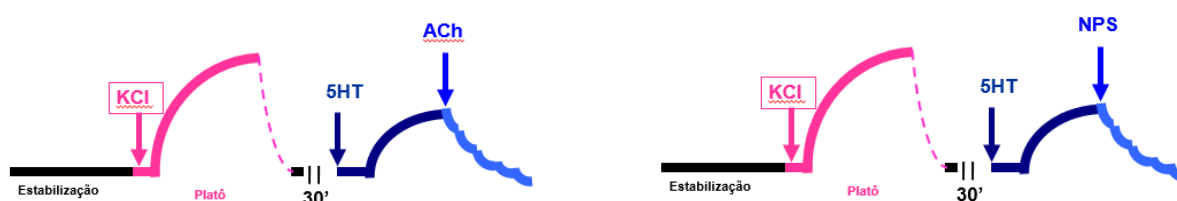


Figura 4 – Esquema ilustrativo do protocolo de reatividade vascular

Para investigar o efeito do tratamento com Fe sobre a resposta vasoconstrictora, foram realizadas curvas concentração-resposta ao U46619, um agonista seletivo de receptor TP para tromboxano A₂ (10^{-13} a 10^{-4} M) nos 4 grupos estudados. A resposta vasoconstrictora foi normalizada em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl, que foi considerada 100 % da resposta contrátil.

Para investigar os mecanismos envolvidos na hiperreatividade vasoconstrictora identificada no grupo injetado com a maior dose, algumas incubações foram feitas previamente à realização das curvas concentração-resposta ao U46693 somente neste grupo (200 mg/kg/dia) e comparados com os mesmos efeitos produzidos pela incubação em anéis retirados do grupo Ct, seguindo o esquema ilustrado na figura 5:

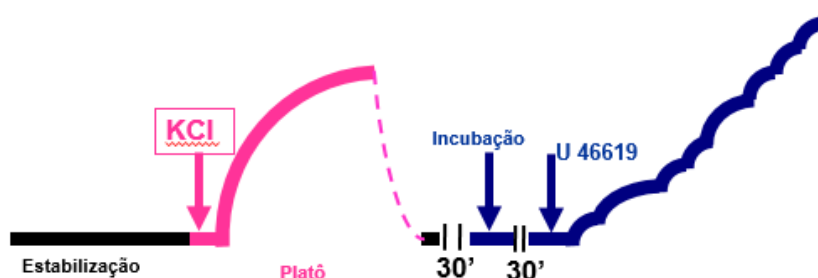


Figura 5 – Protocolos de pré-incubação no estudo da reatividade vascular.

3.6.2. Papel da via do óxido nítrico nos efeitos da sobrecarga de ferro

Para avaliar se a sobrecarga de Fe altera a participação do NO na resposta contrátil ao U46619, os anéis de artéria pulmonar de resistência foram incubados por 30 minutos com um inibidor inespecífico da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Para estimar a magnitude do efeito modulatório do NO, foi calculada

a diferença das áreas abaixo da curva do U46619 na presença do L-NAME em relação à situação controle (sem incubação) tanto no grupo Fe quanto no Ct.

3.6.3. Papel do estresse oxidativo nos efeitos da sobrecarga de ferro

Na literatura é bem descrito que a elevada produção de EROs contribui para a disfunção endotelial (LASSÈGUE et al., 2012; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; NGUYEN DINH et al., 2013). Para verificar o envolvimento de diferentes EROs no efeito provocado pela sobrecarga de Fe na resposta contrátil à U46619, uma vez que sua produção em excesso altera a reatividade vascular principalmente por reduzir a biodisponibilidade de NO, foram utilizados: tempol (1mM), composto permeável à membrana que reage com $O_2^{\cdot-}$ mimetizando a SOD; dimetil-sulfóxido (DMSO, 100 μ M), que na concentração utilizada tem propriedade de neutralizar a ação lesiva dos OH^{\cdot} (ROSE & HODGSON, 1993; SPEIRS, 1994); e a catalase (1000 U/L), enzima capaz de degradar o H_2O_2 e produzir O_2 e H_2O . Todos também separadamente administrados no banho 30 minutos antes da realização das curvas com o U46619, e seus efeitos comparados pela diferença das áreas abaixo das curvas com e sem a droga incubada nos dois grupos experimentais.

3.6.4. Papel do receptor AT_1 nos efeitos da sobrecarga de ferro

Para testar o papel da ativação do receptor AT_1 na resposta vasoconstrictora aumentada ao U46619, utilizamos o antagonista de AT_1 (losartan, 10 μ M) sendo adicionado 30 minutos antes da construção de curvas de concentração-resposta. Da mesma maneira, seu efeito foi avaliado pela comparação entre as diferença das áreas

abaixo das curvas com e sem a droga incubada nos anéis dos dois grupos experimentais.

3.6.4.1. Resposta vasoconstritora à angiotensina II

Diante dos resultados obtidos, tivemos a necessidade de avaliar a reatividade vascular à angiotensina II (Ang II), realizando curvas de concentração-resposta (10^{-10} a 10^{-5} M). Assim como as respostas constritoras ao U46619, a vasoconstrição à Ang II foi expressa como porcentagem da resposta máxima induzida pelo KCl.

3.7. Análise histológica pulmonar após sobrecarga de ferro

Amostras dos pulmões foram fixadas em formalina a 4 %. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e banhados em parafina a 60 °C. Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados, por meio de um micrótomo (Leica RM 2125 RTS), em secções de 5 µM de espessura e os cortes montados em lâminas. Antes da coloração, as lâminas permaneceram por no mínimo 2h em estufa a 58 °C. A seguir foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) ou ferrocianeto de potássio (Azul da Prússia) e picrossirius red para analisar morfometria do pulmão, deposição de Fe tecidual e quantificação das fibras colágenas, respectivamente.

Nas etapas da coloração, inicialmente as lâminas contendo as secções de pulmão foram desparafinizadas através da imersão em três banhos consecutivos de xilol P.A., seguido de xilol P.A e álcool P.A. (1:1) e três banhos consecutivos de álcool P.A. Para hidratação as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool P.A. e em banhos

seriados de água destilada, em cada banho as lâminas permaneceram por cinco minutos. A seguir as colorações específicas foram seguidas.

Para a coloração da Azul da Prússia, as secções foram imersas durante 30 min em solução contendo ferrocianeto de potássio (5 %) e ácido clorídrico (5 %) (1:1). A seguir as lâminas foram imersas durante cinco minutos em água destilada e imersas em banho com eosina (1:30 min) para corar os componentes básicos, realizando a contra coloração. Após banho com água destilada novamente por cinco minutos, foram realizadas imersões em três banhos consecutivos de xilol P.A., seguido de xilol P.A e álcool P.A. (1:1) e três banhos consecutivos de álcool P.A. Ao fim, foi inserido meio de imersão e montagem (DPX Mountant) e lamínula sob as secções presentes na lâmina. Já na coloração do picrossirius red, após as etapas de desparafinação e hidratação, utilizou-se o corante picrossirius por 40 minutos e em seguida seguiu-se as mesmas etapas dos banhos de álcool e xilol.

A coloração com H&E segue as etapas semelhantes à coloração com azul da Prússia, exceto a solução de ferrocianeto de potássio (5 %) com ácido clorídrico (5 %) (1:1) que é substituída por solução contendo hematoxilina (para corar partes ácidas, especialmente os núcleos), onde as lâminas com secções de pulmão foram inseridas por quatro minutos. Além disso, inclui-se a etapa de diferenciação com álcool ácido (1 %) após o banho com eosina.

As imagens foram coletadas no microscópio óptico Leica DM 2500 com a objetiva de 10X e 40X, acoplado a uma câmera digital Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para Ct e Fe. Para análise, artérias com diâmetro equivalentes às artérias pulmonares de resistência (terceiro ramo) e semelhantes aos diâmetros averiguados nos estudos de reatividade vascular foram analisadas em

quatro segmentos do pulmão por animal para obter a média amostral do respectivo animal. As análises de morfometria e quantificação do Fe e colágeno do pulmão foram realizadas utilizando o *Software Image J*. (Download realizado de forma gratuita no site <https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.8. Produção *in situ* de óxido nítrico e ânions superóxido em artérias pulmonares de resistência de ratos após sobrecarga de ferro

A disponibilidade local de NO foi determinada utilizando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) conforme descrito anteriormente (MARQUES et al., 2015, KOJIMA et al., 1998). As artérias pulmonares de resistência foram dissecadas da mesma maneira que descrito para as análises de reatividade vascular e incorporadas em um meio de congelamento (Killik-OCT EasyPath, Erviegas Ltda, SP, Brasil). Secções arteriais transversais (10 µm) foram obtidas utilizando um criostato e foram equilibradas em condições idênticas durante 30 min a 37 °C com tampão de fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45 mM). Após 30 min, as secções foram incubadas numa câmara umidificada protegida contra a luz a 37 °C com DAF-2 a 8 µM na mesma solução tampão.

O corante fluorescente oxidativo diidroetídio (DHE) foi utilizado para avaliar a produção/presença de O₂^{•-} *in situ* como descrito anteriormente (RIBEIRO JUNIOR et al., 2016). A hidroetidina permeia livremente as células e é oxidada na presença de O₂^{•-} ao brometo de etídio, que é aprisionado pela intercalação com o DNA. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e tem um espectro de emissão de 610 nm. Os segmentos de tecido congelados foram cortados em secções de 10 µm de espessura e colocados em uma lâmina de vidro. As secções em série foram equilibradas em condições idênticas durante 30 min a 37 °C em tampão Krebs-HEPES (em mM: 130

NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂ 8,3 HEPES e 11 glicose, pH 7,4). Para avaliar o papel da ativação do receptor AT₁ sobre a produção de O₂^{•-} nas artérias pulmonares de resistência, o tampão fresco contendo DHE (2 µM) na ausência ou presença de losartan (10 µM) foi aplicado topicamente em cada seção de tecido, coberto com um deslizamento de cobertura, incubado durante 30 min em uma câmara umidificada protegida contra a luz a 37 °C.

As imagens digitais foram coletadas em um microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com uma câmera Leica DFC 310 FX usando as mesmas configurações de imagem para os grupos Ct e Fe. Para a quantificação, cinco segmentos de tecido congelado por animal foram amostrados para cada condição experimental. As densidades médias de fluorescência na região alvo foram calculadas usando *software* livre (software Image J 1.44p, National Institutes of Health, EUA).

3.9. Expressão proteica por Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência da sobrecarga de Fe sobre o conteúdo de algumas proteínas de interesse relevantes nas vias identificadas nos estudos funcionais, no tecido pulmonar de ratos dos grupos controle e tratado com Fe na dose de 200 mg/kg/dia. Os órgãos foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras em 4°C com tampão de homogeneização contendo: Tris - HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM, pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C com 6.000 RPM, durante 10

min. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi realizada a quantificação das proteínas pelo método de Lowry (1977). Onde determinou a densidade óptica medindo a absorbância num espectrofotômetro multi-canal a $\lambda = 750$ nm (Cary, Varian). Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:25). Em seguida aliquotados os volumes para uma carga de 50 μ g de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 μ M; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação mantidas à temperatura de 95°C durante 4 minutos.

As amostras foram carregadas em gel SDS-poliacrilamida 7,5, 10 e 12% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 10%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed), juntamente com um marcador de peso molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa), previamente imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) com alta capacidade de tamponamento, sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas. Isto promovia a separação das proteínas no gel e após o término da eletroforese as proteínas eram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente ativada com água durante 20 segundos. Para isso, o gel, a membrana e papel Whatman (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) foram colocados em um sistema “sanduíche”. O método realizado foi o de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado a uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25

mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 % e Metanol 20 %) à 8°C com uma corrente de 0,25 A V por 20 horas.

Uma vez as proteínas transferidas, as membranas foram deixadas durante duas horas à temperatura ambiente em agitação contínua com uma solução de bloqueio para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5% de leite desnatado em pó, dissolvida em solução de lavagem das membranas: 10 mM de Tris-HCl a pH = 7,5; 100 mM de NaCl; e 0,1 % Tween-20 (TBS-T). Em seguida, também sob agitação constante, as membranas foram incubadas *overnight* (18h) a 4°C com os anticorpos primários para as proteínas de interesse e para a proteína utilizada como controle interno, β -actina (anticorpo monoclonal de rato anti- β -actina, 1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA), diluídos em solução à 5% de leite desnatado em pó ou 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5). Foram incubados os seguintes anticorpos primários contra as proteínas de interesse: anticorpo monoclonal para eNOS (1:200, BD transductions Laboratories, San Jose CA, USA), p-eNOS (1:200, Millipore, San Francisco, USA), Mn-SOD (1:2000, Millipore, San Francisco, USA), Cu/Zn-SOD (1:1000, Sigma, St. Louis, USA), gp91^{phox} (1:1600, BD Transduction Laboratories, San Jose, USA) e receptor AT₁ (1:150, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários, foram feitas três lavagens sucessivas de dez minutos cada, com uma solução TBS-T, para eliminar os restos do anticorpo primário que não se uniram. As membranas foram então incubadas durante uma hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com o correspondente anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete: anticorpo IgG anti-camundongo (1:5000; StressGen Bioreagent Corp., Victoria, Canada) ou IgG anti-coelho (1:5000; Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Após a incubação com o anticorpo secundário, as

membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) (as soluções foram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS).

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana durante 5 min a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). A aquisição da imagem foi realizada usando ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas, e os dados de expressão proteica foram expressos como razão da expressão proteica da β -actina, usadas como controle de carga.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Nas construções das curvas concentração-resposta, foi realizada análise de regressão não-linear com ajuste sigmoidal (tipo *slope* variável). A análise inferencial foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado para comparação entre duas médias ou ANOVA de 1 ou 2-vias para comparação entre várias médias quando adequado, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Prism Software 6 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes sempre que $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal e comprimento da tíbia

Os animais do grupo Ct e Fe apresentaram peso semelhante ao início do protocolo, mas verificou-se que gradualmente ao longo das semanas os grupos submetidos à administração de Fe (nas maiores doses) apresentam menor ganho de peso corporal quando comparados ao grupo Ct (Figura 6). Além disso, também apresentaram redução do crescimento ósseo, mensurado através do comprimento da tíbia (tabela 2). Além de redução no peso e tamanho corporal evidenciado nos grupos Fe, também foi possível notar hiperpigmentação na pele e anexos, sendo ainda mais notável nos animais do grupo Fe 200.

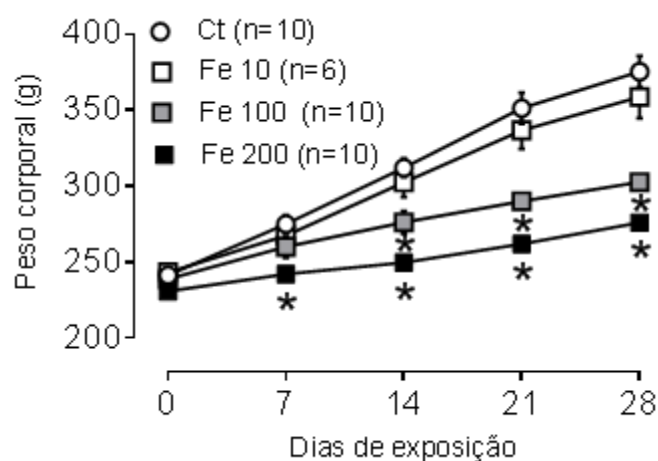


Figura 6 – Acompanhamento do peso corporal ao longo do tratamento

Peso corporal de ratos do grupo controle (Ct) e grupo tratado com ferro (Fe) 10, 100 e 200 mg/kg/dia. Antes e ao longo do tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses. * $P < 0,05$ vs Ct.

4.2. Consumo de ração

Realizou-se um acompanhamento do consumo de ração dos animais, e observou-se que com o progresso do tratamento os grupos Fe 100 e Fe 200 apresentavam diminuição do consumo de ração quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7 A). A fim de estabelecer a relação do ganho ou perda de peso com o consumo de ração, normalizou-se o consumo de ração dos animais pelo peso do animal, e observou-se que o consumo médio/100 g de peso corpóreo foi semelhante entre os grupos (Figura 7 B).

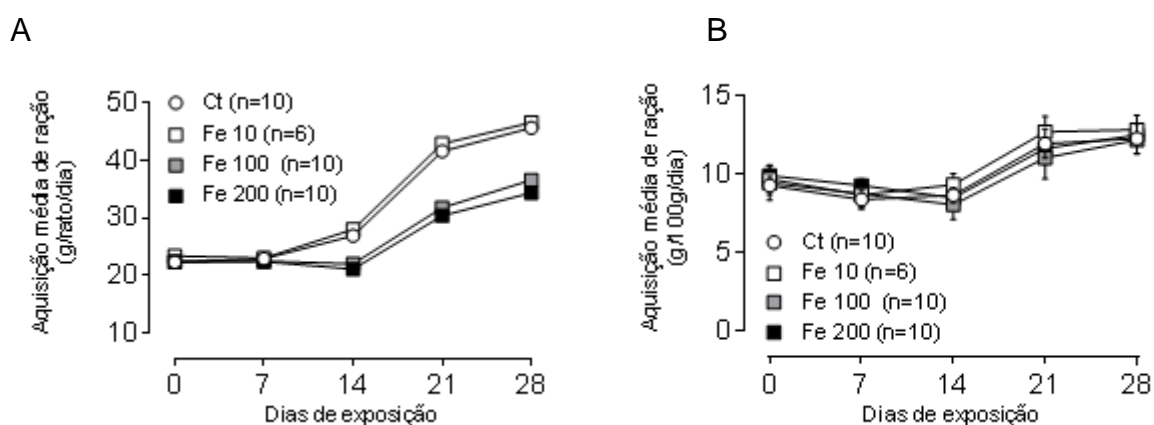


Figura 7 – Consumo alimentar ao longo do tratamento

Consumo diário de ração médio por animal (A) e normalizado pelo peso dos animais (B) do grupo Ct e grupo Fe 10, 100 e 200. Os resultados expressos em média \pm EPM.

4.3. Biometria após 4 semanas de protocolo

Ao fim do tratamento, os ratos dos grupos Fe 100 e Fe 200 apresentaram menor peso corporal em relação ao grupo Ct e Fe 10, que foi acompanhado também menor comprimento da tíbia (tabela 2).

	Controle	Ferro dextrano 10 mg/kg/dia	Ferro dextrano 100 mg/kg/dia	Ferro dextrano 200 mg/kg/dia
Peso corporal inicial (g)	224,4 ± 5,2	218,3 ± 5,9	219,1 ± 7,3	227,5 ± 2,7
Peso corporal final (g)	347,3 ± 7,4	342,3 ± 9,9	284,5 ± 6,4 *	276,1 ± 2,3 *
Comprimento da tibia (mm)	37,5 ± 0,3	36,8 ± 0,4	34,4 ± 1,2 *	34,52 ± 0,3 *
Peso do VD (mg)	177.2 ± 6.9	162.5 ± 6.7	155.6 ± 5.9	194.0 ± 9.6*
VD/corpo (mg.g ⁻¹)	0.50 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.65 ± 0.03 *
VD/tibia (mg.mm ⁻¹)	4.77 ± 0.17	4.37 ± 0.14	4.28 ± 0.11	5.74 ± 0.31 *
Índice de Fulton	0.244 ± 0.009	0.243 ± 0.006	0.231 ± 0.002	0.378 ± 0.020*
Peso do VE (mg)	786 ± 18	692 ± 19	705 ± 4	576 ± 18 *
VE/corpo (mg.g ⁻¹)	2,074 ± 0,121	1,931 ± 0,062	2,425 ± 0,071	1,900 ± 0,035
VE/tibia (mg.mm ⁻¹)	0.210 ± 0.005	0.180 ± 0.005	0.190 ± 0.001	0.170 ± 0.005*
Peso do pulmão (mg)	860 ± 57	849 ± 62	782 ± 95	986 ± 115
Pulmão/corpo (mg.g ⁻¹)	2.66 ± 0.19	2.60 ± 0.26	2.80 ± 0.39	3.34 ± 0.42
Pulmão/tibia (mg.mm ⁻¹)	22.6 ± 1.4	23.5 ± 1.7	22.5 ± 2.6	29.1 ± 3.1
Água no pulmão (%)	77.85 ± 0.37	77.79 ± 0.88	78.27 ± 1.64	79.63 ± 1.03

Tabela 2 - Parâmetros biométricos de grupos experimentais

VD: ventrículo direito. VE: ventrículo esquerdo. Índice de Fulton: a proporção do peso do VD em relação ao peso VE (ventrículo esquerdo + septo) foi tomada como medida de hipertrofia VD. % teor de água pulmonar, perda de peso após a secagem foi tomado como marcador de congestão pulmonar. Os valores são médios ± SEM. * P <0,05 vs. Controle.

Nossos resultados demonstram que quando o VD foi normalizado pelo peso corporal e pelo tamanho da tibia dos animais, o VD dos animais pertencentes ao grupo Fe 200 foi significativamente maior do que todos os outros grupos. Simultaneamente, o índice de Fulton foi maior no grupo Fe 200, indicando hipertrofia de VD. Porém, o peso do VE foi menor no grupo com sobrecarga de Fe. No entanto, não houve diferença significativa no peso dos pulmões dos animais, mesmo quando normalizada pelo peso

corporal e pelo tamanho da tíbia, confirmada quando a porcentagem de água nos pulmões foi avaliada, o que não foi diferente em nenhum dos grupos (Tabela 2).

4.4. Reatividade vascular de artérias pulmonares de resistência

4.4.1. Resposta contrátil ao cloreto de potássio.

Para verificar a capacidade contrátil do músculo liso vascular independente de vias associadas a receptores de membrana ativados por agonistas, as artérias pulmonares de resistência foram submetidas à incubação com solução de KCl (80 mM) após a normalização do estiramento dos anéis. Esse protocolo é normalmente realizado para verificar a integridade da resposta de cada anel frente à concentração alta de potássio, e também utilizado para normalizar as contrações induzidas por fármacos, já que é através dessa incubação que observamos a resposta máxima de cada anel. Adicionalmente, alterações na contração ao KCl nos grupos experimentais podem ser um indicativo de lesão/alteração do músculo liso vascular. No entanto, os diferentes protocolos de administração de Fe não alteraram a resposta vasoconstritora ao KCl (Figura 8), resultados que afastam prejuízos na capacidade contrátil do músculo liso vascular.

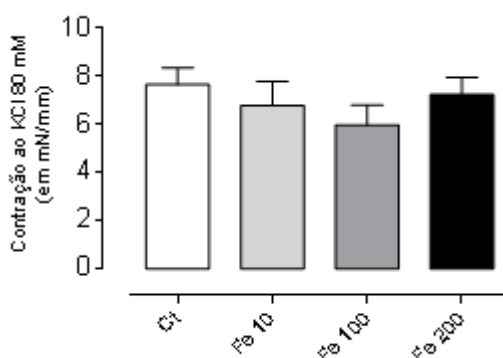


Figura 8 – Resposta vasoconstrictora ao cloreto de potássio

Resposta máxima dos anéis vasculares à incubação com cloreto de potássio a 80 mM em todos os grupos experimentais. Os resultados (média \pm EPM).

4.4.2. Reatividade vascular ao agonista de receptor TP, U46619

A resposta contrátil ao agonista do receptor para tromboxano A₂ (TP), o U46619, foi avaliada em curva concentração dependente nos grupos experimentais. Como mostrado na figura 9, a quantidade de Fe-dextran administrada no grupo Fe 10 foi insuficiente para alterar a resposta vasoconstritora, enquanto a resposta vasoconstritora nos anéis do grupo Fe 100 foi menor comparada a todos os outros grupos. Porém, a concentração do Fe 200 aumentou a resposta vasoconstritora quando comparada aos anéis dos animais de todos os grupos, apresentando uma hiper-reatividade.

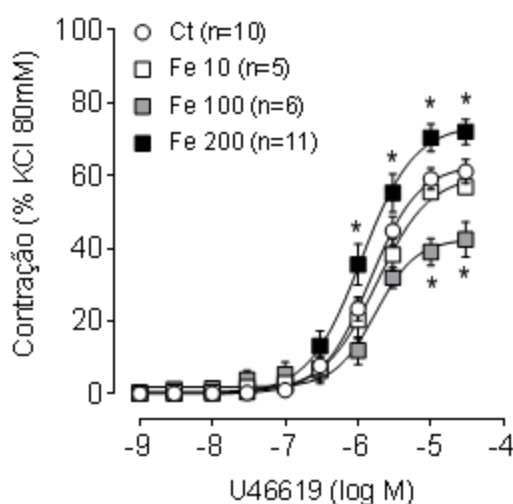


Figura 9 – Efeitos da administração de ferro sobre a resposta vasoconstritora

Resposta contrátil induzida pela administração do agonista de receptor TP para tromboxano A₂, U46619, no grupo controle (Ct) e grupos tratados com ferro (Fe) 10, 100 e 200mg/kg/dia. Os resultados (média ± EPM) estão expressos da contração induzida por 80 mM de KCl normalizados pelo tamanho dos anéis. O número de animais usados está indicado entre parênteses. *P<0,05 vs. Ct Anova duas vias e pós teste de Bonferroni.

4.4.3. Vasodilatação dependente do endotélio

Não houve alteração na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, avaliada por meio da resposta a acetilcolina, nos grupos dos animais ferro 10, 100 e 200, quando comparados ao grupo dos animais controle (Figura 10 A).

4.4.4. Vasodilatação independente do endotélio

Não houve alteração na resposta vasodilatadora independente do endotélio, avaliada por meio da incubação com um doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio, nos grupos dos animais tratados com ferro 10, 100 e 200, quando comparados com o grupo dos animais controle (Figura 10 B).

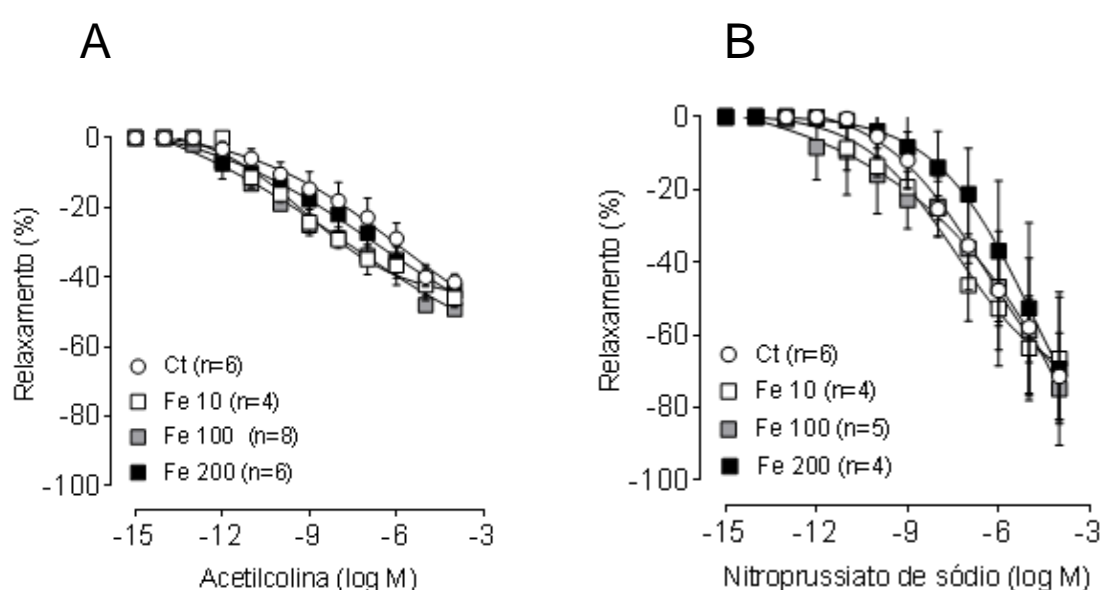


Figura 10 – Efeitos da administração de ferro sobre a resposta vasodilatadora

Resposta vasodilatadora induzida pela administração de acetilcolina (A) e do doador de NO nitroprussiato de sódio (B), em segmentos de anéis do terceiro ramo da artéria pulmonar de ratos do grupo controle (Ct) e grupo tratado com ferro (Fe) 100 e 200mg/kg/dia. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos em % de relaxamento em relação à pré-contracção induzida por 5HT. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Procuramos avaliar os efeitos de três diferentes concentrações de ferro sobre o sistema cardiovascular, porém, não identificamos impacto algum na concentração que chamamos de exposição branda ao Fe (10 mg/Kg/dia). Portanto a partir daqui investigaremos mais a fundo os impactos provocados pelas exposições moderada (Fe 100) e severa (Fe 200).

4.5. Estudo da hemodinâmica ventricular esquerda e direita

Na figura 11 pode ser observado que a PSVD (figura 11 A) e FC (figura 11 E) não foram diferentes entre os grupos, mas no grupo Fe 200 a PDfVD foi menor que Ct (figura 11 B). Todavia, de maneira interessante, tanto a derivada positiva quanto negativa de pressão do VD foi reduzida apenas no grupo Fe 100 em relação ao Ct indicando certo grau de disfunção do VD (figura 11 C e D). Além disso, a constante temporal de relaxamento (tau) do VD foi elevada somente no grupo Fe 200 (figura 11 F), que sugere disfunção no relaxamento.

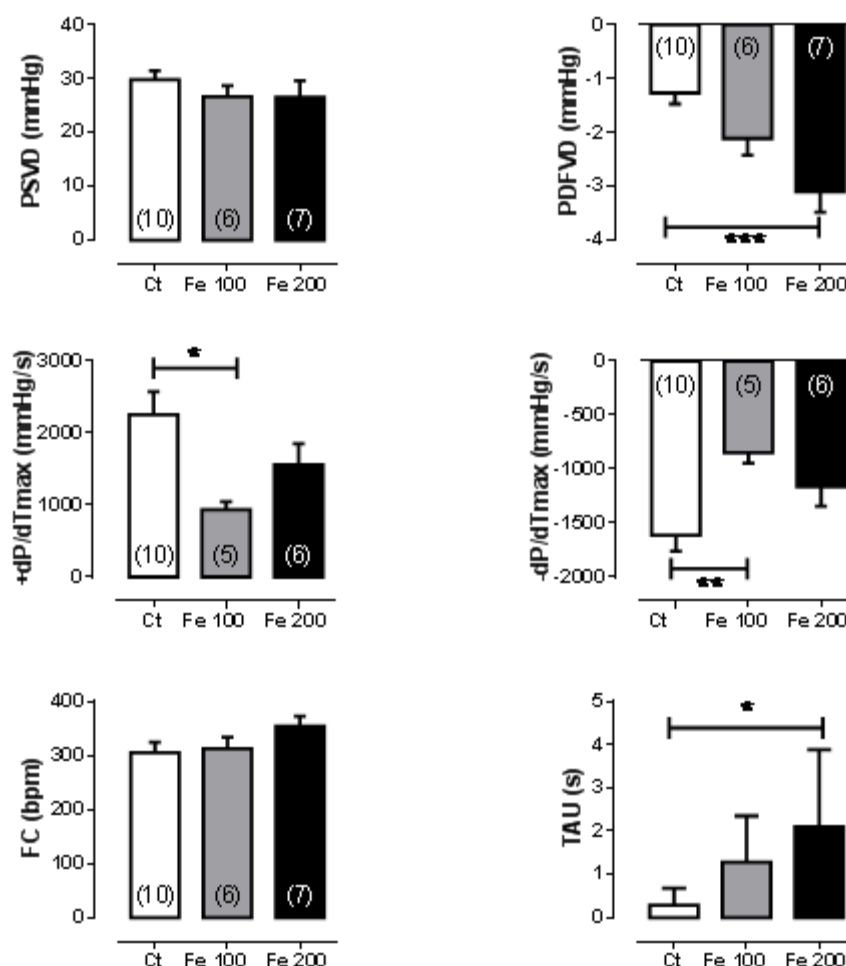


Figura 11 – Avaliação hemodinâmica do ventrículo direito

Pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) (A); pressão diastólica final do VD (PDfVD) (B); derivadas máximas positiva e negativa da pressão de VD (+dP/dTmax e -dP/dTmax) (C-D), frequência cardíaca (FC) (E) e constante Tau de relaxamento do VD (F). Valores expressos em média \pm EPM. *P<0.05 e **P<0.01 Fe vs Ct por Anova 1 via com pós teste Bonferroni. O número de animais é indicado entre parênteses.

Apesar disso, parece que nenhuma alteração ocorreu na hemodinâmica do VE (Figura 12), visto que a PSVE e PDFVE foram semelhantes entre os grupos, assim como as derivadas temporais e a constante de relaxamento do VE.

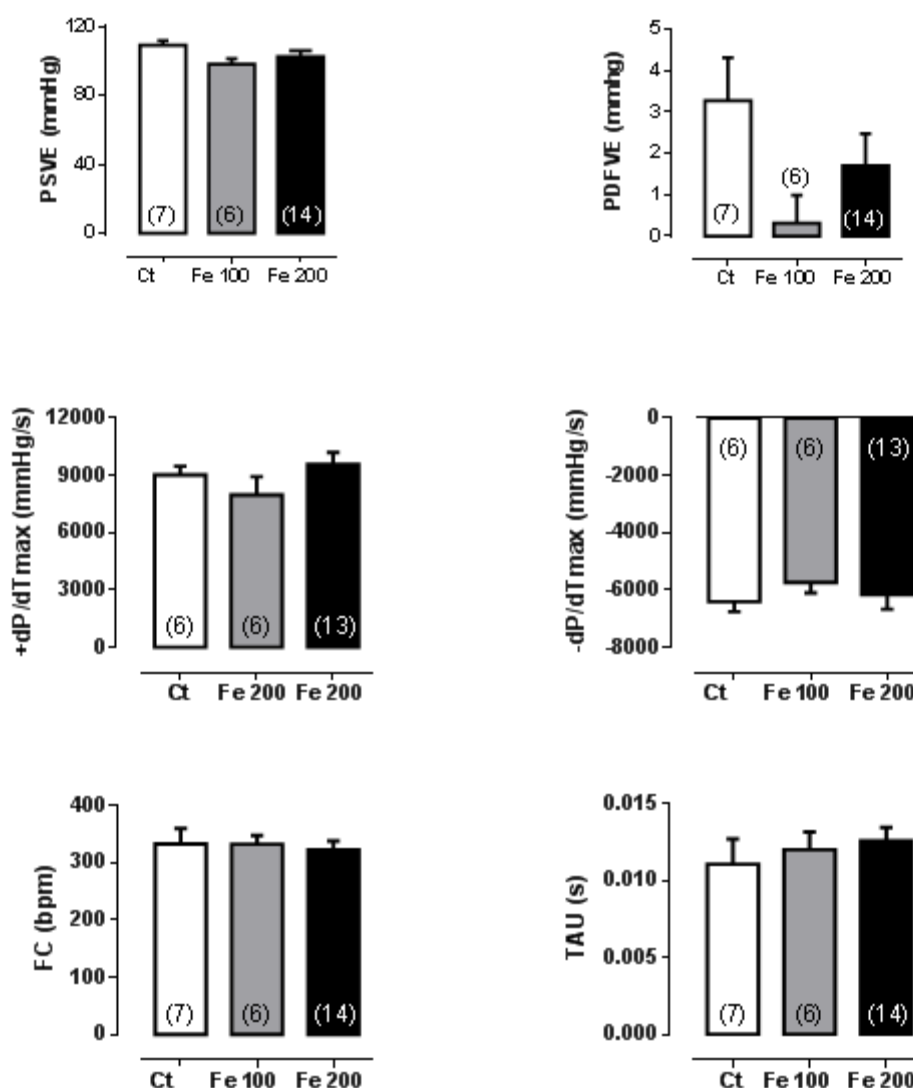


Figura 12 – Avaliação hemodinâmica do ventrículo esquerdo

Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) (A); pressão diastólica final do VE (PDFVE) (B); derivadas máximas positiva e negativa da pressão de VE (+dP/dTmax e -dP/dTmax) (C-D), frequência cardíaca (FC) (E) e constante temporal de relaxamento (TAU) (F). Valores expressos em média ± EPM. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.6. Níveis de ferro sérico e tecidual

Como demonstrado na figura 13, o grupo Fe 200 apresentou significativo aumento do Fe sérico e saturação da transferrina quando comparados ao Ct e Fe 100. Além disso,

evidenciamos aumento significativo de depósito de Fe no fígado, baço e pulmões do grupo Fe 100, e mais intenso no fígado, baço, coração e pulmões do grupo Fe 200.

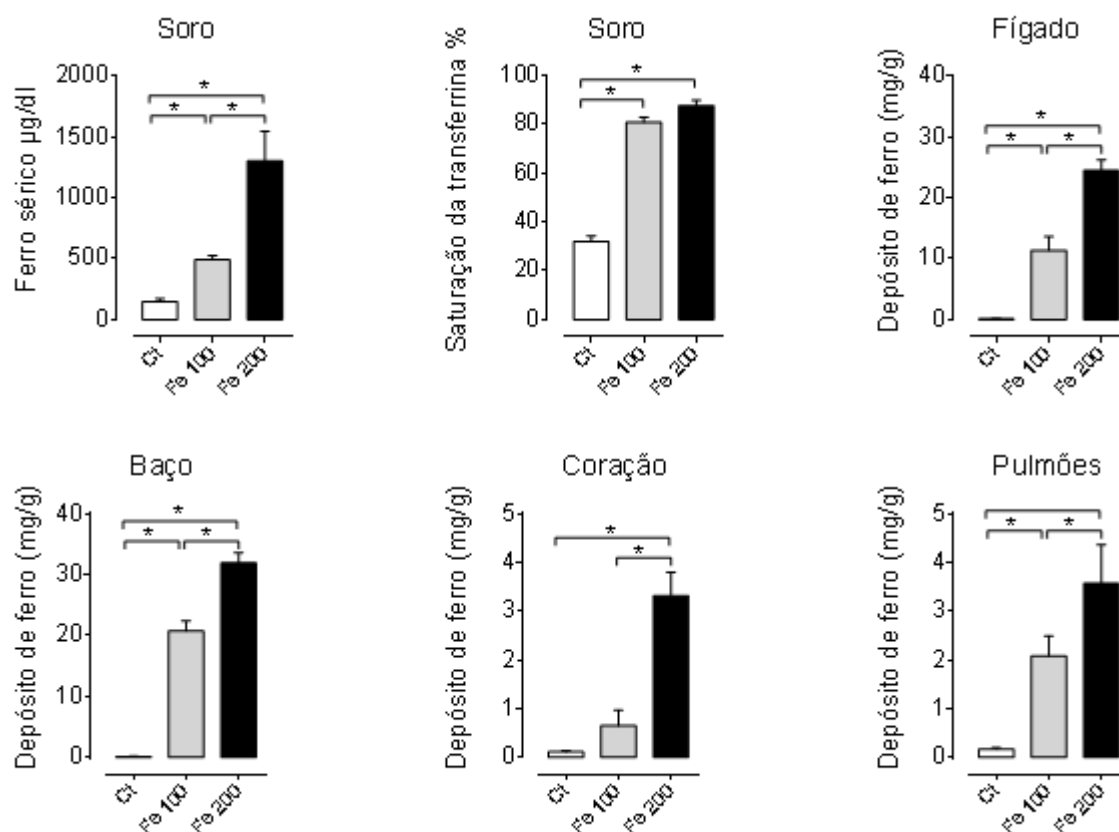


Figura 13 – Níveis de ferro sérico e teciduais

Nível de ferro sérico, saturação da transferrina, depósito de ferro nos tecidos do fígado, baço, coração e pulmões. Valores expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$ ANOVA 1 via seguido de Bonferroni.

Embora nossos resultados hemodinâmicos não tenham evidenciado hipertensão do VD (fato que pode ter ocorrido devido ao O_2 administrado durante o procedimento hemodinâmico), os animais do grupo Fe 200 apresentaram aumento da reatividade vasocontrátil nas artérias pulmonares de resistência e elevação no índice de Fulton (hipertrofia de VD), associado ao maior acúmulo de Fe nos pulmões. Diante disso, resolvemos investigar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos da sobrecarga de Fe 200 sobre a vasculatura pulmonar.

4.7. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica na morfometria da artéria pulmonar

Assim como análise da espectrometria já havia indicado, a análise histológica demonstrou deposição significativa de ferro não-heme apenas nos pulmões de ratos tratados com Fe, como indicado pela coloração azul da Prússia, incluindo deposição de Fe na parede das artérias pulmonares de resistência (Figura 14).

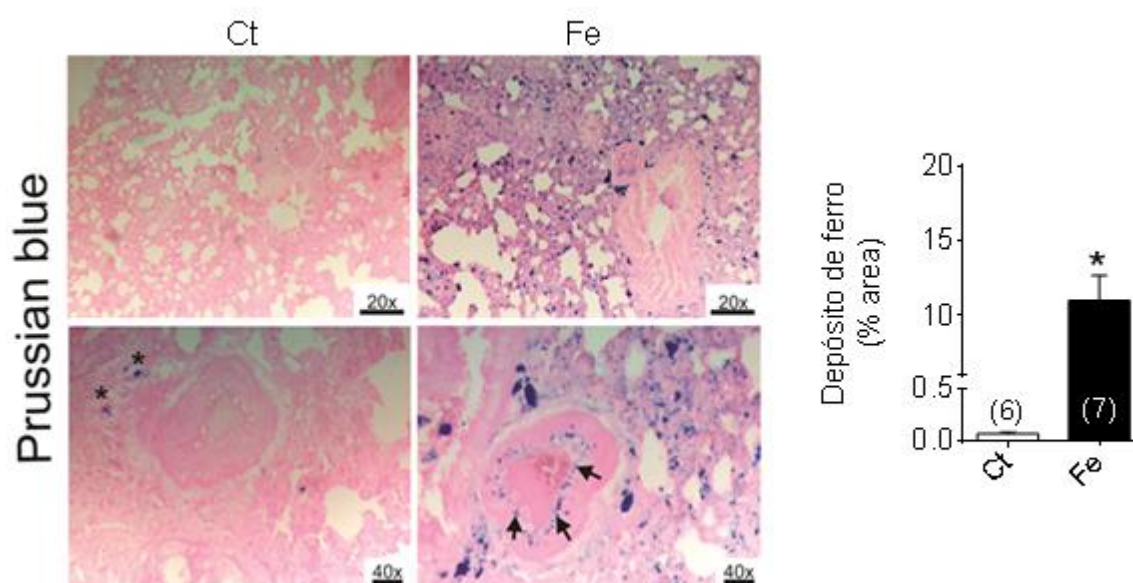


Figura 14 – Análise dos depósitos de ferro no pulmão por histoquímica. Coloração do azul de Prússia indicou raras manchas de Fe (asteriscos) nos controles (Ct), mas o grupo com sobrecarga apresentou coloração positiva intensa. Fotomicrografia 400X mostra Fe marcado na parede da artéria, incluindo endotélio (setas); Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct teste t.

A deposição de colágeno no tecido pulmonar, avaliada por fibras coradas com picrossirius red (Figura 15 A e B), indicou não apenas a fibrose intersticial, mas também a fibrose perivascular no grupo. Além disso, ao buscar seções transversais de pequenas artérias de resistência com dimensões equivalentes às utilizadas nos protocolos funcionais *in vitro*, o diâmetro interno foi reduzido e tanto a área da parede quanto a proporção parede/lumen foram aumentadas (Figura 15 C e D), indicando um remodelamento hipertrófico interno da vasculatura pulmonar.

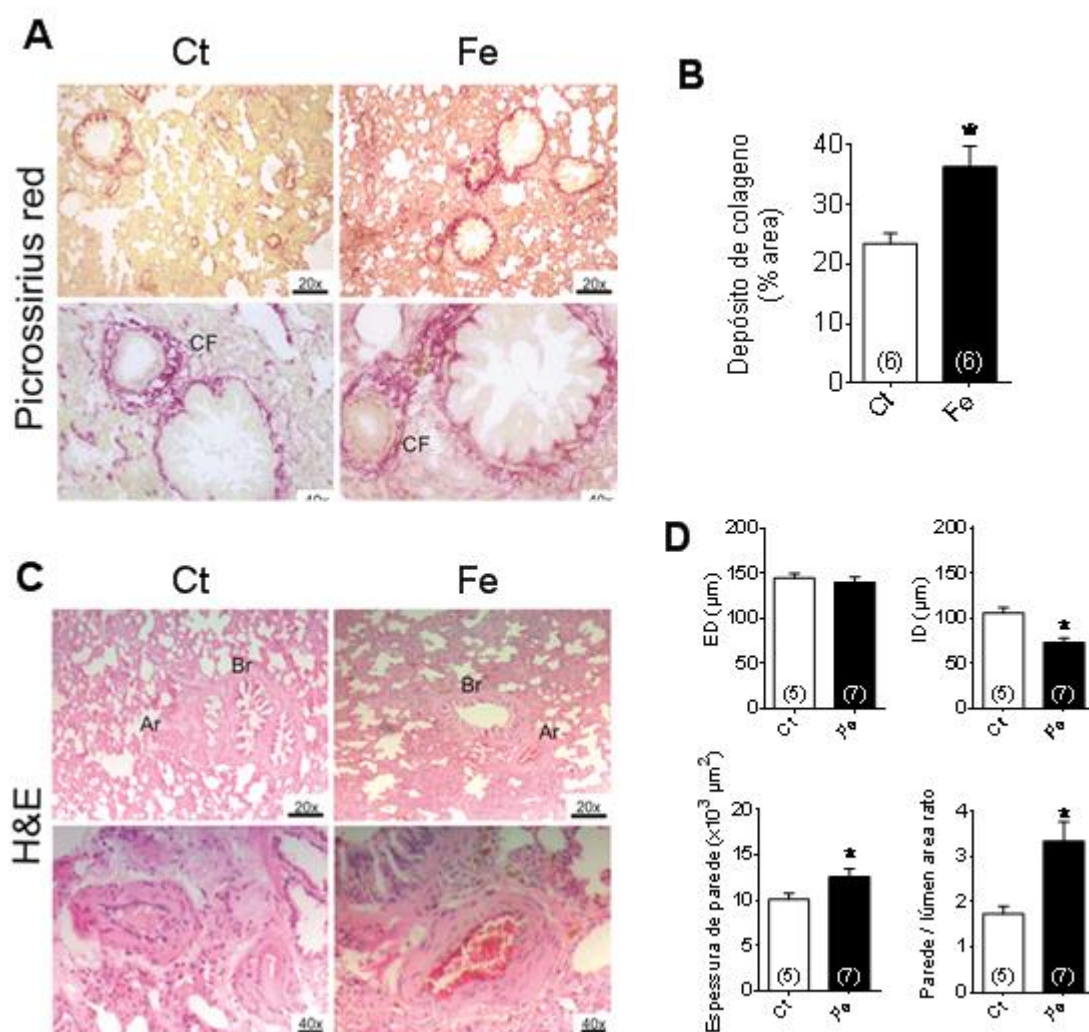


Figura 15 – Histomorfometria do tecido e artérias pulmonares

Coloração com picrosirius red (A) e avaliação semiquantitativa da deposição de colágeno (B). Em C, microfotografias representativas mostram a estrutura do pulmão: artéria pequena (Ar) e bronquiolo (Br) por coloração H&E; Em D, medidas de diâmetro externo (ED), diâmetro interno (ID), área de parede e a relação parede/lúmen de pequenas artérias pulmonares. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct teste t de Student.

4.8. Mecanismos envolvidos na hiper-reatividade vascular pulmonar após sobrecarga de ferro

4.8.1. Papel do óxido nítrico nos efeitos da sobrecarga de ferro sobre a vasculatura pulmonar

Para analisar o papel do NO na resposta vasoconstritora ao U46619, os anéis foram pré-incubados com L-NAME (100 μM), que aumentou a resposta nos anéis Ct,

enquanto nos anéis Fe 200 esse efeito foi menor (Figura 16 A e B), indicando, pela diferença entre as áreas abaixo das curvas (dAAC), menor modulação dependente do NO no grupo Fe 200 (Figura 16 C). Além disso, as artérias pulmonares de resistência do grupo Fe apresentaram redução no NO detectado por DAF-2 (Figura 16 D-F). Entretanto, a expressão tanto de eNOS como de p-eNOS está aumentada, embora o nível de fosforilação (relação p-eNOS / eNOS) não alterou no grupo Fe (Figura 16 G-I).

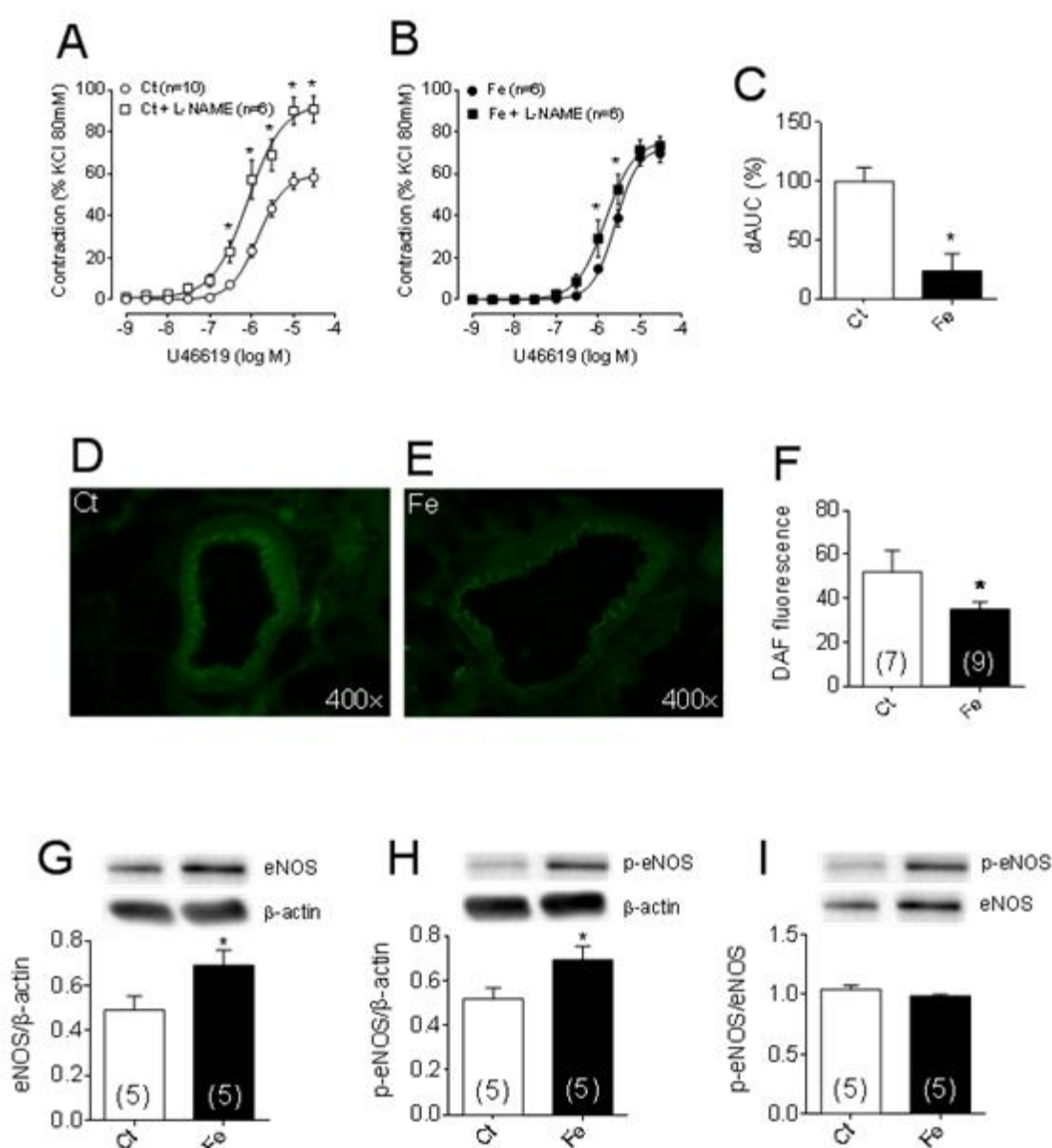


Figura 16 – Papel do óxido nítrico nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares. Curvas concentração-resposta para U46619 com e sem L-NAME (100 μM) nos grupos Ct (A) e Fe (B). Em C, a magnitude do efeito foi medida como a dAAC com e sem intervenção. Microfotografias fluorescentes das artérias

marcadas com DAF-2 nos grupos Ct (D) e Fe (E) e a medida representada em F. Expressão proteica de eNOS (G), p-eNOS (H) e a proporção de p-eNOS/eNOS (I). Os dados são média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct usando ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni em A e B; E teste t de Student em C, F, G e H. O número de animais é indicado nos parênteses.

4.8.2. Papel do estresse oxidativo na hipereatividade vasoconstritora das artérias pulmonares de resistência após sobrecarga de ferro

Sabe-se que o aumento da produção de EROs pode estar associada a redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumento da vasoconstrição. Assim, nossa próxima etapa foi avaliar os efeitos promovidos pela incubação com diferentes agentes antioxidantes na reatividade vascular ao U46619 de ambos os grupos experimentais.

Como observado nas figuras 17 A e B, os anéis das artérias pulmonares de resistência de ambos os grupos quando incubados com DMSO, agente com propriedade de neutralizar a ação dos OH^{\bullet} , exibiram redução da reatividade vasocontrátil. Entretanto, pode-se perceber que o efeito promovido pelo DMSO no grupo Fe teve maior magnitude (Figura 17 C).

Já na incubação com catalase, enzima antioxidante responsável por decompor o H_2O_2 , a redução na reatividade vascular só foi detectada no grupo Fe, não havendo qualquer efeito em Ct (Figura 17 D-F).

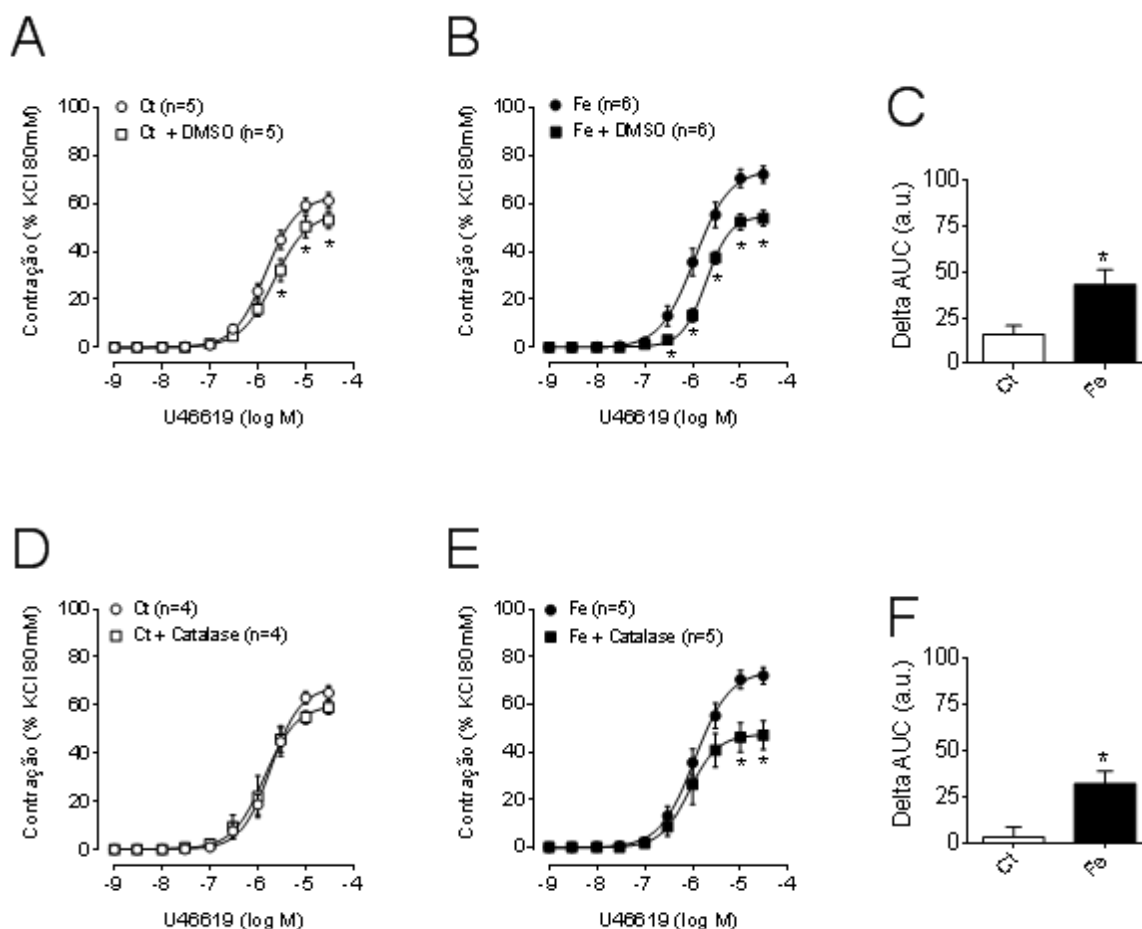


Figura 17 – Papel do radical hidroxila e peróxido de hidrogênio nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares.

As curvas de concentração-resposta para U46619 foram calculadas após a pré-incubação das artérias dos grupos controles (Ct) e sobrecarga de ferro (Fe) com DMSO 100 mM (A e B), 1000 U catalase (D e E). A magnitude do efeito foi medida como a diferença entre as áreas sob as curvas (dAAC) com e sem a respectiva intervenção (C e F). Os dados são expressos como a média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct usando ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni em A, B, D, E, e teste t de Student em C e F. O número de animais é indicado nos parênteses.

Além disso, como sabidamente a produção de $O_2^{\cdot-}$ pode exercer papel majoritário na redução da disponibilidade de NO e também promover aumento da reatividade vascular, realizamos incubações com o tempol, um mimético da SOD permeável em membrana; além de investigar a expressão da NADPH oxidase e SOD nos extratos proteicos pulmonares, enzimas envolvidas na produção e degradação do $O_2^{\cdot-}$, respectivamente (Figura 18). A incubação com tempol, assim como o DMSO, reduziu a resposta vasoconstritora em ambos os grupos, porém com maior magnitude no grupo Fe (Figura 18 A-C).

Além disso, no grupo Fe foi detectado aumento no conteúdo da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase, principal enzima responsável pela geração de O₂⁻ (Figura 18 D). Por outro lado, provavelmente como um mecanismo compensatório, houve aumento na expressão proteica da isoforma Cu/Zn-SOD sem modificações na isoforma mitocondrial Mn-SOD (Figura 18 E e F).

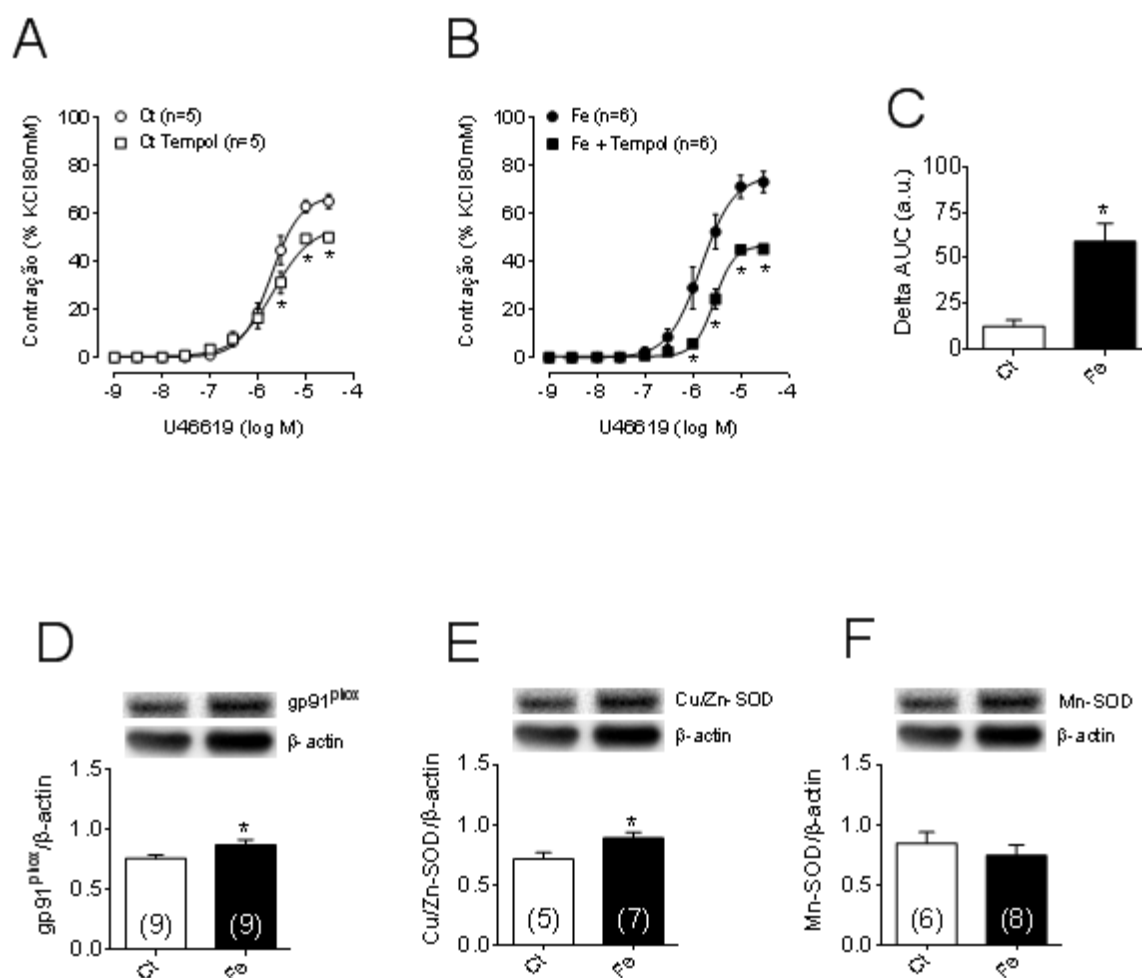


Figura 18 – Efeitos da sobrecarga de ferro sobre a produção de ânion superóxido em artérias pulmonares

As curvas de concentração-resposta para U46619 foram calculadas após a pré-incubação das artérias dos controles (Ct) e ratos de sobrecarga de ferro (Fe) com tempol (1mM). A magnitude do efeito foi medida como a diferença entre as áreas sob as curvas (dAAC) com e sem a respectiva intervenção (C). Os teores de proteínas de gp91^{phox} (D), Cu/Zn-SOD (E) e Mn-SOD (F) foram analisados por Western-blot no tecido pulmonar e a β-actina foi utilizada como controle interno em cada amostra. Os dados são expressos como a média ± SEM. *P <0,05 vs Ct usando ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni em A e B e teste t de Student em C, D, E e F. O número de animais é indicado nos parênteses.

4.8.3. Papel do receptor AT₁ sobre os efeitos da sobrecarga de ferro na reatividade contrátil e estresse oxidativo da vasculatura pulmonar

Para investigar se a ativação do sistema renina-angiotensina local estava envolvida nas mudanças induzidas pelo Fe na reatividade vascular das artérias pulmonares de resistência, o antagonista AT₁ losartan (10 μ M) foi incubado previamente às curvas concentração-resposta para U46619 (Figura 19).

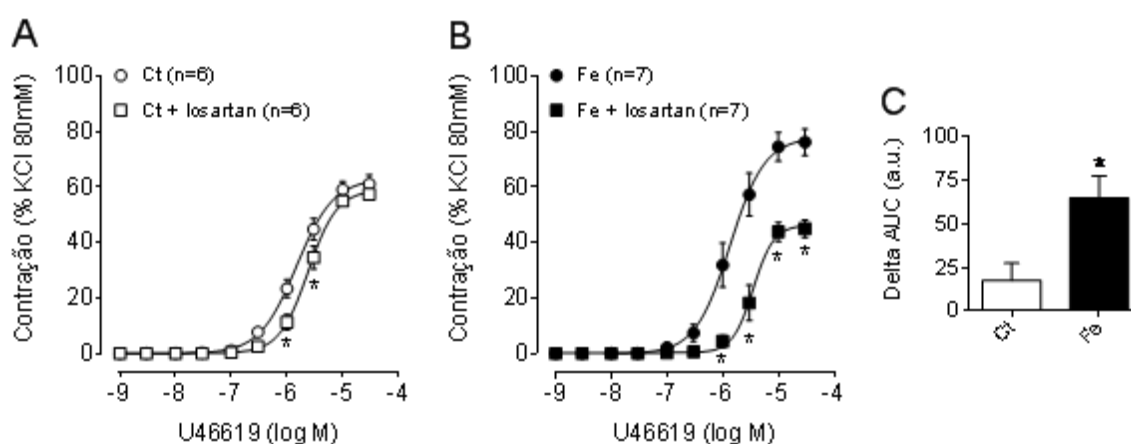


Figura 19 – Papel do receptor AT₁ nos efeitos da sobrecarga de ferro em artérias pulmonares.

As curvas de concentração-resposta para U46619 foram calculadas após a pré-incubação das artérias dos controles (Ct) e ratos de sobrecarga de ferro (Fe) com losartan 10 μ M (A e B) e a magnitude do efeito foi medida como a diferença entre as áreas abaixo sob as curvas (dAAC) com e sem intervenção (C). Os dados são expressos como a média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct usando ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni em A e B e teste t de Student em C. O número de animais é indicado nos parênteses.

Diante do resultado de uma grande inibição da hiperreatividade vascular pelo losartan incubado nas artérias pulmonares de resistência do grupo que sofreu sobrecarga de ferro (Figura 19 A-C), buscamos investigar se havia maior participação de receptores AT₁. Para isso, realizamos curva concentração resposta de angiotensina II, que se mostrou significativamente aumentada no grupo Fe em comparação ao Ct (Figura 20 A). Entretanto, a expressão do AT₁ por westem blot, não demonstrou aumento estatisticamente significativo no grupo Fe (Figura 20 B).

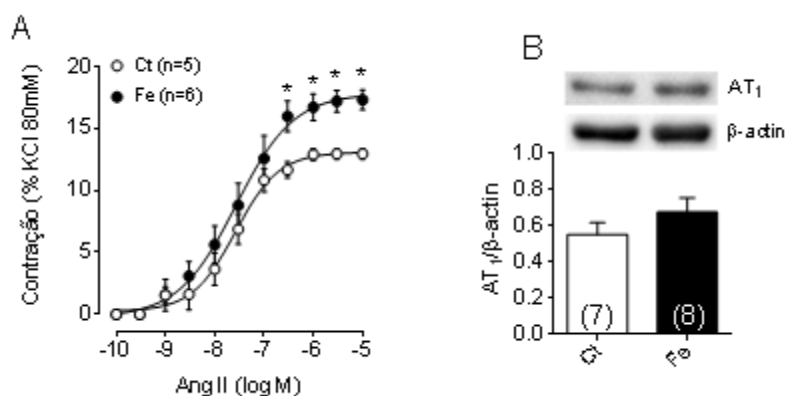


Figura 20 – Reatividade vascular à angiotensina II e expressão do receptor AT₁

Curvas concentração-resposta de angiotensina II (Ang II) (A). O receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁) foi analisado por Western-blot em tecido pulmonar e a β-actina foi utilizada como controle interno em cada amostra (B). Os dados são expressos como a média ± SEM. * P < 0,05 vs Ct usando ANOVA duas vias e pós teste de Bonferroni. O número de animais é indicado nos parênteses.

Por fim, para verificar se houve maior produção de O₂^{•-} e se esse aumento fora dependente da ativação do receptor AT₁, o corante fluorescente DHE sensível ao O₂^{•-} foi usado na ausência e presença de losartan. Como observado na figura 21 A, as artérias do grupo Fe apresentaram maior fluorescência que Ct e, após incubação com losartan, este aumento de fluorescência foi normalizado (Figura 21 A e B).

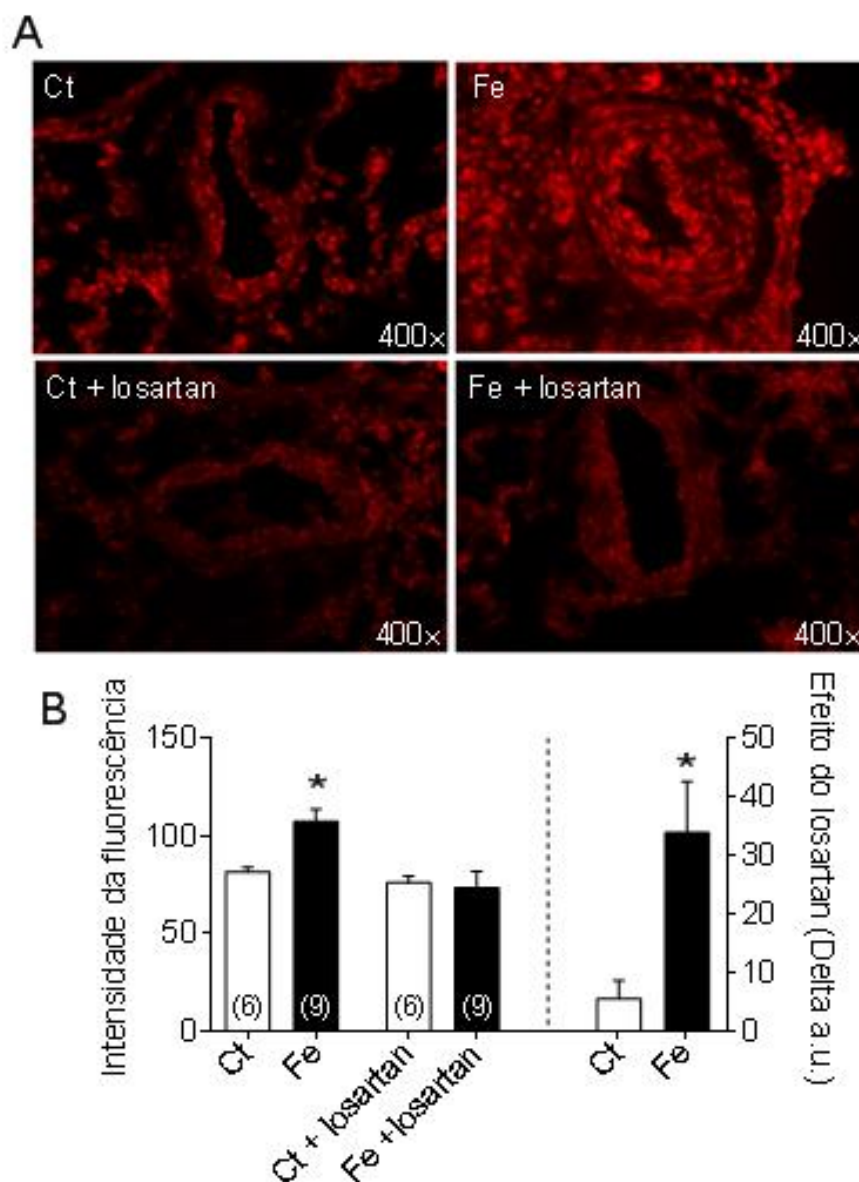


Figura 21 - Papel do receptor AT_1 na produção de ânion superóxido vascular após sobrecarga de ferro
 Microfotografias fluorescentes marcadas com DHE (A) e análise semi-quantitativa da produção de $O_2^{\cdot -}$ dependente de receptor AT_1 (B) testado com pré-incubação de losartan. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Ct teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

De maneira interessante, vimos que somente os animais expostos com concentrações maiores de Fe (100 e 200mg/kg/dia) apresentaram diminuição no ganho de peso e tamanho da tíbia, e que essa diminuição não parece se justificar por uma menor quantidade de ração ingerida, já que a ingestão diária está adequada para o peso. Da mesma maneira, confirmou-se que as maiores doses cursaram com elevações significantes do Fe sérico e depositado em tecidos-alvo, incluindo os pulmões, o que foi acompanhado de hipertrofia e disfunção de VD e das artérias pulmonares de resistência, que apresentaram remodelamento e aumento de reatividade.

Portanto, a diminuição no ganho de peso e tamanho dos animais tratados com Fe nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia quando comparados aos animais dos grupos Ct e Fe 10, indicava a princípio haver diminuição também no consumo de ração dos mesmos animais. Porém, realizamos a normalização do consumo de ração pelo peso do respectivo animal e não observamos qualquer diferença estatística entre os grupos, durante todo o período de análise, o que indica que, para o tamanho do animal, seu consumo estava adequado.

Semelhante ao descrito em estudos anteriores em modelos de roedores (BARTFAY & BARTFAY 2000, LOU et al., 2009, MARQUES et al., 2015), de fato parece haver uma restrição ao ganho de peso na sobrecarga de Fe crônica. Além disso, os grupos injetados com 100 e 200 mg/Kg/dia exibiram menor comprimento da tíbia, sugerindo um crescimento ósseo reduzido, que poderia ser explicado em parte pelo fato da peroxidação lipídica prejudicar crescimento e desenvolvimento (KUHN, 2002). Porém, segundo (SKORDIS & KYRIAKOU, 2011) este crescimento reduzido pode também ser consequência de falhas induzidas pelo Fe em glândulas endócrinas, como

alterações nas gonodas e tireode, parecido ao observado em crianças portadoras de talassemia beta maior; ou pelo impedimento da osteogênese segundo outro autor (MANDALUNIS P, 1997; 2005).

Aliado a isso, outros processos como à diminuição da atuação dos osteoblastos, aumento e produção de IGF-1 (DIAMOND PR et al., 1991; MAHACHOKLERTWATTANA P, 2003) podem estar relacionados nas disfunções e limitações no desenvolvimento ósseo detectados em seres humanos com sobrecarga de Fe. Finalmente, pode-se supor também que, o acúmulo de Fe no fígado dos grupos que foram submetidos as doses de 100 e 200 mg/Kg/dia, pode relacionar-se a provável lesão hepática como descrita por LOU et al., 2009 e, em decorrência do metabolismo modificado das proteínas, contribuir para o prejuízo no desenvolvimento ósseo e menor ganho de peso.

É consenso que o efeito desastroso do Fe nas sobrecargas deve-se principalmente à sua capacidade oxidativa e baixas taxas de eliminação. Embora a insuficiência cardíaca esteja, junto com as arritmias, entre as principais manifestações cardíacas tanto em sobrecargas de origem primária quanto secundária, decorrente majoritariamente do acúmulo de Fe nas células miocárdicas (PIPERNO, 1998; ANDREWS, 1999), nossa avaliação hemodinâmica não foi capaz de identificar disfunção do VE em nenhum grupo. Embora contradiga boa parte da literatura, de fato, não se tem dados com modelos de sobrecarga de Fe em ratos que demonstrem quadro clínico típico de cardiopatia, como é descrito em camundongos (BARTFAY et al., 1999b; BARTFAY & BARTFAY, 2000a; OUDIT et al., 2003; OUDIT et al., 2004). Aliás, este dado está em concordância com os resultados do peso dos pulmões e do teor de água nesse órgão similares entre os grupos, visto que em casos de insuficiência do VE se instala congestão e eventual edema pulmonar devido ao

trabalho deficiente da bomba esquerda (BEUTLER et al., 2000). Por outro lado, ainda que não se tenha identificado aumento da PSVD, os parâmetros de contração e relaxamento ($+dP/dt_{\text{máx}}$ e $-dP/dt_{\text{máx}}$, respectivamente) estavam prejudicados no grupo Fe 100 e a constante temporal TAU do relaxamento de VD estavam prejudicados no grupo Fe 200 em relação ao Ct, sugerindo disfunção no relaxamento.

A disfunção do VD no presente contexto poderia ser explicada por duas principais razões: um efeito danoso direto do Fe sobre as células miocárdicas do VD, provocando disfunção decorrente do acúmulo do metal no tecido; ou um efeito indireto do Fe sobre a vasculatura pulmonar, induzindo sobrecarga hemodinâmica para o VD e consequente remodelamento e disfunção. Visto que houve significativo acúmulo de Fe no tecido cardíaco e não quantificamos o nível de Fe nas câmaras separadamente, não podemos descartar a primeira possibilidade, incluindo uma possível maior suscetibilidade do tecido cardíaco direito em relação à massa esquerda.

Para investigar os possíveis efeitos da administração de ferro sobre a vasculatura pulmonar, utilizamos o modelo de estudo *in vitro* da reatividade vascular de artérias pulmonares de resistência. Sabe-se que o leito arterial pulmonar inclui segmentos principais diferentes em aspectos embriológicos, anatômicos e funcionais. Enquanto as artérias da via proximal exibem propriedades elásticas e condutoras, as artérias intrapulmonares pequenas que controlam mais amplamente a resistência vascular pulmonar. Assim, utilizamos os ramos arteriais de 3ª ordem da artéria pulmonar, considerados vasos de resistência, com diâmetros internos entre 100 e 300 μm (KUHR et al., 2012).

Nos protocolos de reatividade contrátil das artérias pulmonares de resistência, identificamos que enquanto nenhuma mudança ocorreu no grupo Fe 10, e uma

redução da resposta constritora foi detectada no grupo Fe 100, o grupo Fe 200 cursou com hiper-reatividade contrátil em resposta ao U46619. Assim, diante deste aumento da resposta constritora ao agonista TP das artérias pulmonares de resistência isoladas do grupo Fe 200, e do aumento do peso de VD e do índice de Fulton, acreditamos que é grande a possibilidade do impacto do Fe como indutor de HP no modelo de rato e consequente sobrecarga de VD. De fato, vários parâmetros sugestivos de HP têm sido demonstrados em doenças que concomitantemente cursam com sobrecarga de ferro secundária (GLADWIN et al., 2004; HALALIS, 2005, DENISE & HARRISON 2006; MCLAUGHLIN et al., 2006; SENGSIK et al., 2014), ainda o papel do Fe não tenha sido abordado por esses autores. Embora nossos resultados hemodinâmicos não tenham alterado também no VD, isso pode ser decorrente de um efeito que foi amenizado pelo fornecimento de oxigênio aos animais durante a realização do procedimento, já que o aumento de oxigênio na circulação pulmonar contribui para uma vasodilatação e redução da resistência pulmonar (STAUB, 1985; ARCHER et al., 1989).

Apesar do aumento da resposta constritora das artérias pulmonares de resistência no grupo Fe 200 parecer devido a menor biodisponibilidade de NO, nossos resultados demonstram relaxamento a ACh e ao NPS é igual entre os grupos. Isso pode parecer contraditório, visto que como apresentado nos resultados, o grupo Fe cursou com elevação das EROs, que sabidamente reduz a ação do NO e, dessa maneira, prejudicaria o relaxamento à ACh. Porém, acreditamos que esse prejuízo na biodisponibilidade de NO parece mais evidente nas situações contrarregulatórias como, por exemplo durante o estiramento ou estímulo contrátil com o agonista TP, enquanto em situações de estímulo mais intenso para a produção de NO (isto é, administração de ACh), o estresse oxidativo presente não é suficiente para influenciar na resposta

vasorrelaxante a ponto do método de análise da reatividade que utilizamos conseguir detectar. Em uma curva com acetilcolina por exemplo, a ativação de receptores muscarínicos presentes do endotélio culmina em grande influxo de cálcio para o interior da célula com intenso estímulo para a eNOS, superior ao grau de atividade normalmente encontrado nas situações basais. O aumento da Cu-Zn SOD também pode proteger mais facilmente o NO produzido pela ACh do que o NO basal (DAVEL et al., 2006). Outra razão, que não buscamos investigar no presente estudo, é que na vigência de prejuízo de determinadas vias de vasodilatação dependente do endotélio, é comum identificarem aumentos em outras vias, tais como as dependentes de prostaciclina e EDHF. De fato, uma regulação compensatória dessas outras vias é descrita devido à menor biodisponibilidade e/ou ação do NO em doenças vasculares tais como a HP (MORIO et al., 2007). Assim, em condições adversas, a simples manutenção do relaxamento endotélio-dependente à ACh não deve ser interpretada como ausência de disfunção endotelial. Por esse motivo, os próximos passos que se seguiram foram investigar os possíveis mecanismos envolvidos na hiper-reatividade constritora das artérias pulmonares de resistência no grupo Fe 200, além de investigar os impactos da sobrecarga crônica de ferro sobre o remodelamento vascular nos pulmões.

Evidências recentes indicam que a modulação do manejo de Fe, como a depleção de receptores de transferrina, é capaz de amenizar os efeitos da HP e o remodelamento vascular pulmonar induzidos por hipoxia ou por monocrotalina em ratos (NAITO et al., 2013, NAITO et al., 2016). Além disso, um maior grau de sobrecarga de Fe é identificado como fator de risco para HP em pacientes com hemólise crônica (MELONI et al., 2015). Todavia, não há nenhum relato sobre como a sobredose de Fe atua na vasculatura pulmonar até o momento. Assim, nosso estudo parecer ser o primeiro a

descrever que as artérias pulmonares de resistência de ratos com sobrecarga crônica de Fe reduzem diâmetro interno e aumentam a relação parede/lúmen, indicando um remodelamento hipertrófico concêntrico desses vasos pulmonares. Associado ao processo de hipertrofia, identificou-se também aumento do conteúdo de colágeno no parênquima pulmonar. Sabe-se que o remodelamento da parede vascular e as alterações na matriz extracelular podem levar a um aumento da resistência vascular pulmonar e consequentemente à HP (MCLAUGHLIN & MCGOON, 2006; TUDER, 2017). Nesse sentido, dentre inúmeros fatores descritos, também a biodisponibilidade reduzida de NO e aumento da ação da angiotensina II parecem estar envolvidos no remodelamento arterial vascular pulmonar e na HP (TUDER, 2017). Conforme identificado nos protocolos *in vitro* para a reatividade vascular, poderíamos propor que alguns fatores tais como redução do NO e aumento de EROs e da ação da angiotensina II também pudessem desempenhar um papel na gênese do remodelamento vascular pulmonar e da matriz extracelular no modelo de sobrecarga de ferro em rato.

O papel da redução na modulação nitrérgica sobre o tônus da vasculatura pulmonar é fortemente sugerido uma vez que a incubação L-NAME provocou apenas aumento discreto no grupo Fe quando comparada às artérias de controle e, reforçando esta linha de evidência, a detecção *in situ* mostrou uma menor quantidade de NO. Esses dados estão em concordância com estudos envolvendo sobrecarga de Fe e seus efeitos sobre a vasculatura sistêmica, isto é, artéria aorta (DAY et al., 2003; MARQUES et al., 2015). Entretanto, houve um aumento no conteúdo da eNOS no grupo Fe, tanto da forma fosforilada quanto na eNOS total. Além disso, os protocolos de incubação de DMSO, catalase e tempol indicam que as EROs exercem papel na mudança na reatividade vascular devido à sobrecarga de Fe. O $O_2^{\cdot -}$ podem reagir com

NO e reduzir sua ação, podemos especular que nosso modelo de sobrecarga de Fe reduz a disponibilidade de NO mediada por estresse oxidativo, com um possível *up-regulation* de eNOS na vasculatura pulmonar, embora esta resposta não pareça ter êxito, visto que a quantidade de NO permanece menor no grupo Fe.

Entre as diferentes EROs, o $O_2^{\cdot -}$ desempenha um papel preponderante na redução da disponibilidade de NO (GRIENDLING et al., 2000). A este respeito, buscamos investigar as principais fontes endógenas de produção e degradação do $O_2^{\cdot -}$, isto é, a NADPH oxidase e a SOD, respectivamente (BARBOSA et al., 2010). Nossos dados mostraram uma expressão aumentada de gp91^{phox} (a subunidade catalítica de NOX2) no grupo Fe, que também teve aumento na detecção de $O_2^{\cdot -}$ pela sonda fluorescente DHE. De fato, a redução da sinalização NO que ocorre nos estágios iniciais de diferentes doenças vasculares é frequentemente atribuída a níveis excessivos de $O_2^{\cdot -}$ derivados de NOX2 (JUDKINS et al., 2010; DIKALOV et al., 2014). Ademais, há um provável aumento compensatório do Cu/Zn-SOD (isoforma citosólica) com uma expressão inalterada da Mn-SOD (isoforma mitocondrial). Estudos, demonstraram que a administração crônica de Fe em roedores é capaz de reduzir os mecanismos de defesa antioxidante tais como SOD e catalase no sangue e no fígado (ZHANG et al., 2014; BADRIA et al., 2015), e em estudo anterior de nosso laboratório descreveu que administrações crônicas de Fe-dextrano a 100 mg/Kg/dia foram acompanhadas por aumento da geração de EROs nas artérias da circulação sistêmica e níveis semelhantes de Cu/Zn-SOD vascular (MARQUES et al., 2015).

Finalmente, é reconhecido que a ativação dos receptores AT₁ nos vasos desempenha um papel importante no tônus vascular não apenas por mecanismos que contraem diretamente o músculo liso, mas também pela produção de EROs, principalmente $O_2^{\cdot -}$; devido ao aumento da atividade e/ou expressão de NADPH oxidases vasculares

(NGUYEN DINH CAT et al., 2013). Além disso, demonstramos anteriormente que a reatividade vascular alterada em anéis de aorta de animais sobrecarregados com Fe foi parcialmente mediada pela ativação do sistema renina-angiotensina local (MARQUES et al., 2015). Concordantemente, no presente trabalho o bloqueio agudo do receptor AT₁ não apenas restaurou a disfunção vascular, mas também normalizou o aumento de O₂^{•-} nas artérias pulmonares de resistência obtidas de ratos do grupo Fe. Ao mesmo tempo, vários estudos indicam que, nas artérias de resistência tais como o 3º ramo das artérias pulmonares, a subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase é a principal fonte de O₂^{•-} vascular regulada pela Ang II (TOUYZ et al., 2002, DEMARCO et al., 2007, LEE et al., 2015), contribuindo assim para remodelamento vascular e hipertensão.

O mecanismo exato pelo qual o excesso de Fe conseguiria ativar o sistema renina-angiotensina local, seja por estimulação da formação de Ang II ou pela sensibilização do receptor AT₁ e sua via *downstream*, ainda não é possível definir com precisão. Ribeiro Junior et al., (2017) descreveu que a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) em tecido de artéria mesentérica de resistência é aumentada pela sobrecarga crônica de Fe em ratos, sem alterações no conteúdo do receptor AT₁. No entanto, foi evidenciado no mesmo modelo que atividade da ECA não modifica na aorta, mas este vaso mostra-se hipersensível a Ang II (MARQUES et al., 2015). Alternativamente identificamos que, num regime de administração do dobro de Fe-dextran, embora a expressão de AT₁ nas artérias pulmonares de resistência seja igual entre os grupos, a resposta vasoconstritora pulmonar à Ang II também é aumentada pelo Fe. Esta via parece ser relevante para as alterações morfológicas identificadas nas artérias pulmonares (hipertrofia concêntrica e fibrose), uma vez que sabidamente a ativação de NOX2 mediada pela Ang II participa da mudança das células musculares

lisas dos vasos para um fenótipo proliferativo/secretor. Como resultado, podemos sugerir que a via AT₁ parece ser um modulador potenciador da disfunção vascular nas artérias pulmonares de resistência, aumentando o estresse oxidativo e reduzindo a biodisponibilidade do NO e, dessa maneira, contribuindo para o desenvolvimento do remodelamento arterial pulmonar e hipertensão pulmonar da sobrecarga crônica de Fe.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram pela primeira vez que a sobrecarga crônica de ferro induz alterações estruturais e funcionais da vasculatura pulmonar, desencadeando hipertrofia cardíaca e disfunção do VD, sinais sugestivos de HP embora não tenha sido evidenciada tal hipertensão em nossos ensaios hemodinâmicos. Nossos dados sugerem que estas alterações estão relacionadas à redução da biodisponibilidade de NO e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, provavelmente mediado pela NADPH oxidase regulada pela via do receptor AT₁ hiperativo como principal fonte de O₂^{•-} vascular.

6.1 Perspectivas futuras

Esses novos achados reforçam o papel do sistema renina-angiotensina nas alterações vasculares presentes na sobrecarga crônica de Fe e instigam estudos futuros sobre os impactos benéficos do bloqueio *in vivo* do receptor AT₁ nessas condições.

Podemos pressupor, que a disfunção vascular pulmonar e HP possam estabelecer fenótipos a serem investigados na sobrecarga de Fe, além de constituírem alvos de alternativas terapêuticas para atenuar os prejuízos acarretados nessa condição, tal como falência do VD por exemplo, além de outras complicações.

7. REFERÊNCIAS

- Aessopos A, G Stamatelos , V Skoumas , G Vassilopoulos , M Mantzourani, D Loukopoulos. Pulmonary hypertension and right heart failure in patients with thalassemia intermedia. *Chest* 107: 50–53, 1995.
- Aessopos A, Farmakis D. Pulmonary Hypertension in p-Thalassemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1054: 342-349, 2005.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341(26):1986-95, 1999.
- Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112(2):219-30, 2008.
- Artman M, Olson RD, Boerth RC. Depression of myocardial contractility in acute iron toxicity in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 66. 329-327, 1982.
- Artman M, Olson RD, Boucek RJ Jr, Boerth RC. Depression of contractility in isolated rabbit myocardium following exposure to iron: role of free radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 72. 324-332, 1984.
- Artman M, Olson RD, Boucek RJ Jr, Ghishan FK, Boerth RC. Acute effects of iron on contractile function in isolated rabbit myocardium. *Dev Pharmacol Ther* 1.50-60, 1984.
- Arthur MJ. Iron overload and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 11, 1124-1129, 1996.
- Archer S.L, Nelson D.P, Weir E.K. Simultaneous measurement of O₂ radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *Journal of Applied Physiology* 67 1903-1911, 1989.
- Ávila RA, Silva MASC, Peixoto JP, Kassolf Silva I, Fogaça RTH, Dos Santos L. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicol In Vitro* 36: 38-45, 2016.

- Bacon BR & Britton RS. The pathology of hepatic iron overload: a free radical--mediated process? *Hepatology* 11, 127-137, 1990.
- Bacon BR, Powell LW, Adams PC, et al. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology*. 116:193, 1999.
- Bacon BR. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology*. 120:718, 2001.
- Badria FA, Ibrahim AS, Badria AF, Elmarakby AA. Curcumin Attenuates Iron Accumulation and Oxidative Stress in the Liver and Spleen of Chronic Iron-Overloaded Rats. *PLoS One*. 2015 Jul 31;10 (7):e0134156.
- Barbosa K. B. F.; Costa N. M. B.; Alfenas R. de C. G.; Paula S. O. de; Minim V. P. R.; Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- Barton JC, McDonnell SM, Adams PC, et al. Management of hemochromatosis. Hemochromatosis Management Working Group. *Ann Intern Med*. 129:932, 1998.
- Bartfay WJ, Butany J, Lehotay DC, Sole MJ, Hou D, Bartfay E, & Liu PP. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. *Cardiovasc Pathol* 8, 305-314, 1999a.
- Bartfay WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfay E, Luo X, Backx PH, & Liu PP. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res* 43, 892-900, 1999b.
- Bartfay WJ & Bartfay E. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs* 2, 49-59, 2000a.
- Barreiros ALBS; David JM; David JP. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29, 113-123, 2006.
- Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med* 133. 329-337, 2000.

- Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest* 142. 448-456, 2012.
- Bonnet S, Archer SL. Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther.* 2007 Jul;115(1):56-69.
- Bonkovsky HL & Lambrecht RW. Iron-induced liver injury. *Clin Liver Dis* 4, 409-vii, 2000.
- Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, Romeo MA, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Cnaan A. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 89. 1187-1193, 2004.
- Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68, 26-36, 2005a.
- Cançado RD, 2007. Iron overload and iron chelation in sickle cell disease. *Rev. bras. hematol. Hemoter* 29. 316-326, 2007
- Celi P. O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39 (suplemento especial), 348-363, 2010.
- Covre EP, Freire DD Jr, Dalfior BM, Marques VB, Ribeiro RF Jr, Carneiro Lima MT, Dos Santos L. Low-level lead exposure changes endothelial modulation in rat resistance pulmonary arteries. *Vascul Pharmacol* 85. 21-28, 2016.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327:70–5, 1992.
- Clemla D, Castelain V, Hervé P, et al. Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 20: 1037-1049, 2002.
- Czajka-Narins DM. In: *Vitaminas*. Mahan LK & Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia. 9 ed. São Paulo: Roca 6, 77-122, 1998.

- DAVEL AP; Kawamoto EM; SCAVONE, C.; VASSALLO, D. V.; ROSSONI, Luciana Venturini. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *British Journal of Pharmacology* **JCR**, v. 148, p. 629-639, 2006.
- Davis MT & Bartfay WJ. Dose-dependent effects of chronic iron burden on heart aldehyde and acyloln production in mice. *Biol Trace Elem Res* 99, 255-268, 2004.
- Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, & Fay WP. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 107, 2601-2606, 2003.
- Deussen A, BRAND M, PEXA A, WEICHSEL J. Metabolic coronary flow regulation-current concepts *Basic research in cardiology* 101. 453-464, 2006.
- Denise HT & Harrison WF. Pulmonary hypertension and β -thalassemia major: Report of a case, its treatment, and a review of the literature. *American journal of Hematologic*. 81:443–447, 2006.
- Demant AW, Schmiedel A, Buttner R, Lewalter T, & Reichel C. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 96, 900-903, 2007.
- De Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Antó JM, Künzli N, Janson C, Sunyer J, Jarvis D, Chinn S, Vermeire P, Svanes C, Ackermann-Liebrich U, Gislason T, Heinrich J, Leynaert B, Neukirch F, Schouten JP, Wjst M, Burney P. Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm. *Am J Respir Crit Care Med* 175(1):32-9, 2007.
- Dewitt DS, Mathew BP, Chaisson JM, Prough DS. Peroxynitrite reduces vasodilatory responses to reduced intravascular pressure, calcitonin generelated peptide, and cromakalim in isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 253-261, 2001.
- Diamond Pojer R, Stiel D, Alfrey A, & Posen S. Does iron affect osteoblast function? Studies in vitro and in patients with chronic liver disease. *Calcif Tissue Int* 48, 373-379, 1991.

- Dikalov SI, Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Hilenski L, Lassègue B, Griendling KK, Harrison DG, Dikalova AE. Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 20(2):281-94, 2014.
- Domellof M. Iron requirements, absorption and metabolism in infancy and childhood, *Pediatrics* 10. 329-335, 2007.
- Dustin R. Fraidenburg, Roberto F. Machado. Pulmonary hypertension associated with thalassemia syndromes. *Ann N Y Acad Sci.* 1368(1): 127–139, 2016.
- Drake SF1, Morgan EH, Herbison CE, Delima R, Graham RM, Chua AC, Leedman PJ, Fleming RE, Bacon BR, Olynyk JK, Trinder D. Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292. 323-238, 2007.
- Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). *J Lab Clin Med* 1991; 118: 3-4.
- Edwards CQ, Kelly TM, Ellwein G, & Kushner JP. Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med.* vol 143, 1983; 1890-189.
- Emerit J; Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 55, 2001; 333–339.
- Farmakis D, Aessopos A. Pulmonary Hypertension Associated With Hemoglobinopathies: Prevalent But Overlooked. *Circulation* 123(11):1227-32, 2011.
- Feletou M & Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci* 117. 139-155, 2009.
- Fuqua, B. K., Vulpe, C. D. & Anderson, G. J. Intestinal iron absorption. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 26, 115–9 2012.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288. (5789):373-6, 1980.

- Fleming, RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol* 64. 663-680, 2002.
- Fraidenburg DR, Machado RF. Pulmonary hypertension associated with thalassemia Syndromes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1–13, 2016.
- Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, & Weiss G. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 40, 2189-2194, 2002.
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333: 214–221, 1995.
- Giardina PJ, Grady RW. Chelation therapy in beta-thalassemia: the benefits and limitations of desferrioxamine. *Semin Hematol* 32. 304-312, 1995.
- Guyton AC & Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan, Nona Edição, 1997
- Grotto, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.
- Grotto HZW. Fisiologia e Metabolismo do Ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010; 32: 8-17.
- Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 350:886–895, 2004.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.
- Hagger D, et al. Changes in coagulation and fibrinolysis in patients with sickle cell disease compared with healthy black controls. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 6:93–99, 1995.
- Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT, Zoumbos NC. Heart failure in beta-thalassemia syndromes: a decade of progress. *Am. J. Med.* 118: 957–967, 2005.

- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 5. 358-364, 1987.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246. 501-514, 1986.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85, 1990.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 609-623, 1992.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, & Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418, 2009.
- Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62. (25 Suppl):D42-50, 2013.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss P. *Essential Haematology*. Malden, MA: Blackwell Science; 1–11, 2001.
- Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonar vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 45. 173–202, 2002.
- Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, Drummond GR. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(1):H24-32, 2010.
- Kanani SJ, Poojara RH. Supplementation with iron and folic acid enhances growth in adolescent Indian girls. *J Nutr* 130. (2S Suppl):452S-455S, 2000.
- Kinsella JP, Abman SH. Clinical approaches to the use of high-frequency oscillatory ventilation in neonatal respiratory failure. *J Perinatol* 16. (2 Pt 2 Su):S52-5, 1996.

- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, & Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70, 2446-2453, 1998.
- Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, & Weglicki WB, 2012. d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can J Physiol Pharmacol* 90, 1257-1268.
- Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 2, p. 154-172, 2002.
- Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca^{2+} signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Apr 15;302(8):H1546-62.
- Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 47-61, 2001.
- Kukongviriyapan V, Somparn N, Senggunprai L, Prawan A, Kukongviriyapan U, Jetsrisuparb A. Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E-beta thalassemia. *Pediatr Cardiol* 29. 130-135, 2008.
- Lancaster JJR. Nitric Oxide: Principles and Actions. Academic Press, Inc, 1996.
- Lassègue B, San Martín A, Grindling KK. Biochemistry, physiology and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research* 110: 1364-1390, 2012.
- Lee S, Paudel O, Jiang Y, Yang XR, Sham JS. CD38 mediates angiotensin II-induced intracellular Ca^{2+} release in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52(3):332-41, 2015.
- Lou LX, Geng B, Chen Y, Yu F, Zhao J, & Tang CS. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36. 612-618, 2009.

- Machado, R.F. & M.T. Gladwin. Hemolytic anemia association pulmonary hypertension. In *Pulmonary Vascular Disease*. Mandel, J. & D. Taichman, Eds.: 170–187, 2006.
- Marques VB, Nascimento TB, Ribeiro RF Jr, Broseghini-Filho GB, RossiEM, Graceli JB, dos Santos L. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. *Life Sci* 143. 89-97, 2015.
- Martínez-Revelles S, Avendan˜o MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Perez-Giron JV, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18:51–65, 2013.
- Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapadang A, Domrongkitchaiporn S, Sirisriro R, & Rajatanavin R. Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3966-3972, 2003.
- Mandalunis PM, Cabrini RL, & Ubios AM. Iron overloading inhibits endochondral ossification. *Acta Odontol Latinoam* 10, 55-61, 1997.
- Mandalunis P & Ubios A. Experimental renal failure and iron overload: a histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol Pathol* 33, 398-403, 2005.
- MacNee W. Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part one. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 150. 833–852, 1994a.
- MacNee W. Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part two. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 150.1158–1168, 1994b.
- Meloni A, Detterich J, Pepe A, Harmatz P, Coates TD, Wood JC. Pulmonary hypertension in well-transfused thalassemia major patients. *Blood Cells Mol Dis* 54(2):189-94, 2015.
- Moom SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, Oh CK, & Jeong DC. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac

- function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol* 32, 947-952, 2011.
- Moncada S, Herman AG, Higgs EA, & Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 11, 323-3, 1977.
- Morio Y, Homma N, Takahashi H, Yamamoto A, Nagaoka T, Sato K, Muramatsu M, Fukuchi Y. Activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor is augmented in monocrotaline-induced pulmonary hypertension of rat lungs. *J Vasc Res*. 2007;44(4):325-35. Epub 2007 Apr 16.
- Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 294:81-90, 2005.
- Morris CR, Gladwin MT, Kato GJ. Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr Mol Med* 8(7):620-32, 2008.
- Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 15. 4617-4626, 2009.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41:19–26, 1977.
- McLaughlin V.V, McGoon D.M, Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 114:1417-1431, 2006.
- Naito Y, Fujii A, Sawada H, Hirotani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents further deterioration of renal damage in a chronic kidney disease rat model. *J Hypertens* 31:1203–1213, 2013.
- Naito Y, Hosokawa M, Sawada H, Oboshi M, Hirotani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Nishimura K, Soyama Y, Fujii K, Mano T, Ishihara M, Tsujino T, Masuyama T. Transferrin Receptor 1 in Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling. *American Journal of Hypertension* 29(6) 2016.

- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 17; 98 (15), 2001.
- Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* 1;19(10):1110-20, 2013.
- Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53. 1333-1342, 2010.
- Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP, Backx PH. L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med* 9. 1187-1194, 2003.
- Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ, & Backx PH. Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* 109, 1877- 1985, 2004.
- Palmer RM, Ferrige AG, & Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327. 524-526, 1987.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333. (6174):664-6, 1988.
- Pardo Andreu GL, Inada NM, Vercesi AE, & Curti C. Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Arch Toxicol* 83, 47-53, 2009.
- Pennell DJ, Udelson JE, Arai AE, Bozkurt B, Cohen AR, Galanetto R, Hoffman TM, Kiernan MS, Lerakis S, Piga A, Porter JB, Walker JM, & Wood J. Cardiovascular function and treatment in beta-thalassemia major: a consensus statement from the American Heart Association. *Circulation* 128, 281-308, 2013.
- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 350:2383-2397, 2004a.

- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Nutr.* 26:251-270, 2006a.
- Pietrangelo. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 139:393-408, 2010.
- Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 83(5):447-55, 1998.
- Polonio IB, Acencio MMP, Pazetti R, Almeida FM, Canzian M, Silva BS, Pereira KAB, Souza R. Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar. *Bras Pneumol.* 38 (4):452-460, 2012.
- Prasad AN, Prasad C. Iron deficiency; non-hematological manifestations. *Prog Food Nutr Sci* 15. 255-283, 1991.
- Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 22: 433-449, 2001.
- Ramm GA & Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 25, 433-449, 2005.
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8(12):1383-9, 2002.
- Ribeiro Júnior RF, Marques VB, Nunes DO, Stefanon I, Dos Santos L. Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O₂⁻ production. *Toxicol Lett* 279. 43-52, 2017.
- Rose RJ, Hodgson DR. *Manual of equine practice.* Philadelphia: Saunders 532, 1993.
- Rossi EM, Marques VB, Nunes D de O, Carneiro MT, Podratz PL, Merlo E, dos Santos L, Graceli JB. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. *Toxicol Lett* 240(1):196-213, 2016.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 293(13):1653-62, 2005.

- Ryland D, Reid L. The pulmonary circulation in cystic fibrosis. *Thorax* 30. 285–292, 1975.
- Santos PC, Dinardo CL, Cancado RD, Schetttert IT, Krieger JE, & Pereira AC (2012a). Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34, 311-316.
- Santos PC, Krieger JE, & Pereira AC (2012b). Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci* 13, 1497-1511
- Sengsuk C, Tangvarasittichai O, Chantanaskulwong P, Pimanprom A, Wantaneeyawong S, Choowet A, Tangvarasittichai S. Association of Iron Overload with Oxidative Stress, Hepatic Damage and Dyslipidemia in Transfusion-Dependent β -Thalassemia/HbE Patients. *Indian J Clin Biochem* (3):298-305, 2014.
- Semens M, Reid L. Pulmonary arterial muscularity and right ventricular hypertrophy in chronic bronchitis and emphysema. *Br. J. Dis. Chest* 68. 253–263, 1974.
- Siminoski K, D'Costa M, & Walfish PG. Hypogonadotropic hypogonadism in idiopathic hemochromatosis: evidence for combined hypothalamic and pituitary involvement. *J Endocrinol Invest* 13, 849-853, 1990.
- Siddique A., Kowdley K.V.. Review article: the iron overload syndromes. *Aliment. Pharmacol. Ther* 35. 876-893, 2012.
- Skordis N & Kyriakou A. The multifactorial origin of growth failure in thalassaemia. *Pediatr Endocrinol Rev* 8 Suppl 2, 271-27, 2011.
- Speirs VC. Lameness: approaches to therapy and rehabilitation. In: HODGSON, D.R., ROSE, R. J. *The athletic horse*. Philadelphia: Saunders 343-369, 1994.
- Staub, N. C. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 88:240S–245S, 1985.
- Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Fischer LG, Rich GF. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium dependent vasodilation. *Anesth Analg* 92: 681-687, 2001.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, & Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NADPH

- oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90, 1205-1213, 2002.
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1925–32, 1999.
- Tuder RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell Tissue Res* 367(3):643-649, 2017.
- Thakerngpol K, Fucharoen S, Boonyaphipat P, Srisook K, Sahaphong S, Vathanophas V, & Stitnimankarn T. Liver injury due to iron overload in thalassemia: histopathologic and ultrastructural studies. *Biometals* 9, 177-183, 1996.
- McLaughlin VV & McGoon MD. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 114: 1417-1431, 2006.
- Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K,. Intestinal Ferritin H Is Required for an Accurate Control of Iron Absorption. *Cell Metabolism* 12. 273–282, 2010.
- Vichinsky, E.P. Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1054: 18–24, 2005
- Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 110:2166-2, 2007.
- Zakynthinos E, T Vassilakopoulos, P Kaltsas, E Malagari, Z Daniil, C Roussos, S G Zakynthinos. Pulmonary hypertension, interstitial lung fibrosis, and lung iron deposition in thalassaemia major. *Thorax* 56:737–739, 2001.
- Zurlo MG, De SP, Borgna-Pignatti C, Di PA, Piga A, Melevendi C, Di GF, Burattini MG, & Terzoli S. Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet* 2, 27, 1989.
- Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, Fei Y, Brunt EM, Ruddy DA, Prass CE, Schatzman RC, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5):2492-7, 1998.

Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut* 54(7):980-6, 2005.

Zhang Z, Liu D, Yi B, Liao Z, Tang L, Yin D, He M. Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. *Mol Med Rep.* 2014 Nov;10(5):2255-62